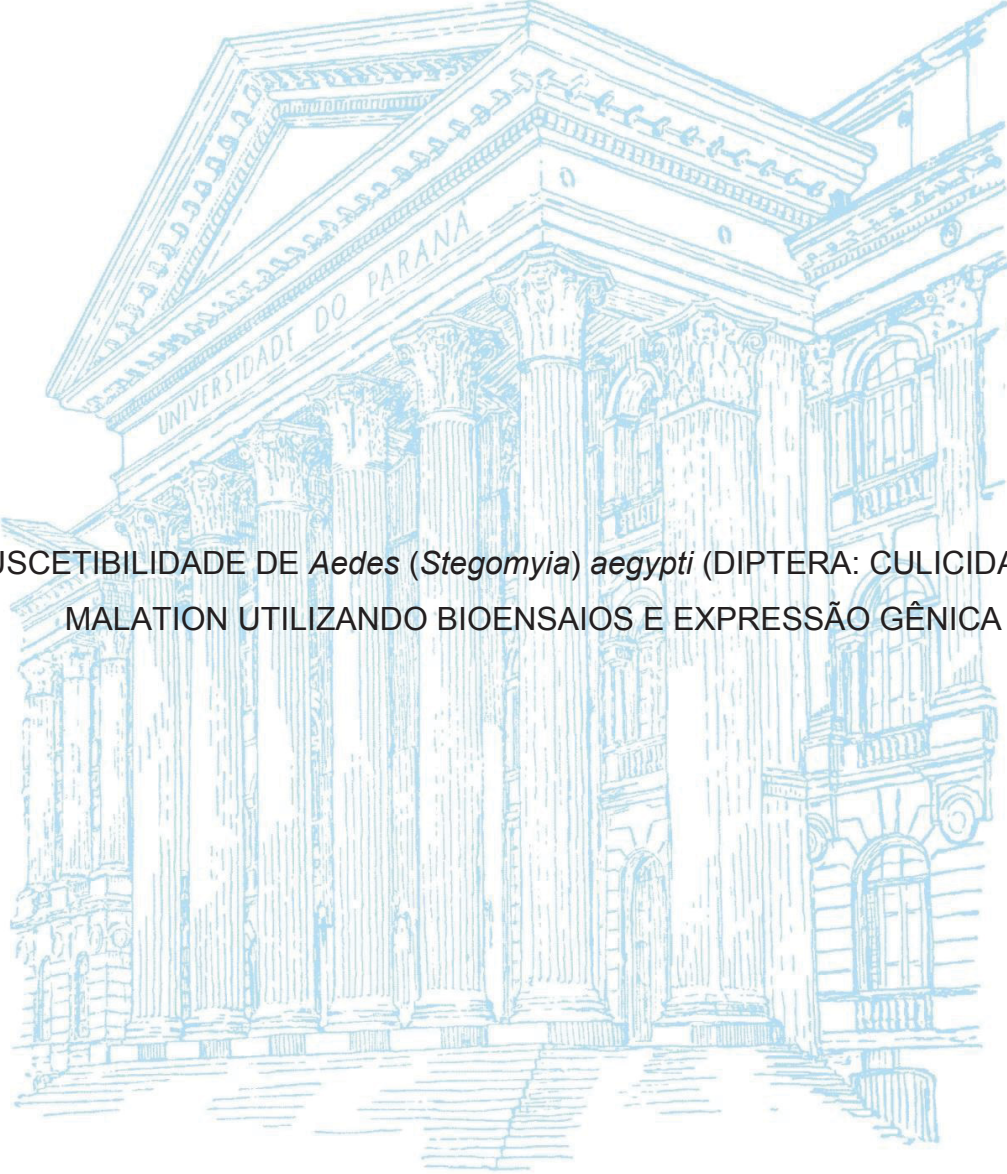


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALERIA SCHUARTZ



SUSCETIBILIDADE DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AO
MALATION UTILIZANDO BIOENSAIOS E EXPRESSÃO GÊNICA

CURITIBA

2021

VALERIA SCHUARTZ

SUSCETIBILIDADE DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AO
MALATION UTILIZANDO BIOENSAIOS E EXPRESSÃO GÊNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas, área de
concentração Entomologia, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Entomologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Mario Antônio Navarro da Silva
Co-orientadora: Dra. Angela Maria Palacio Cortés

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Schuartz, Valeria.

Suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) ao malation utilizando bioensaios e expressão gênica. / Valeria Schuartz. – Curitiba, 2021.

109 f. : il.

Orientador: Mario Antônio Navarro da Silva.

Coorientadora: Angela Maria Palacio Cortês.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

1. Compostos organofosforados. 2. Esterases. 3. Acetilcolinesterase. 4. *Aedes aegypti*. 5. Dengue. 6. Paranaguá (PR). I. Título. II. Silva, Mario Antônio Navarro da. III. Cortês, Angela Maria Palacio. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

CDD (20. ed.) 595.772

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VALERIA SCHUARTZ** intitulada: **"SUSCETIBILIDADE DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AO MALATION UTILIZANDO BIOENSAIOS E EXPRESSÃO GÊNICA."**, sob orientação do Prof. Dr. MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/07/2021 10:59:00.0

MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/08/2021 14:03:30.0

RENATA DA ROSA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Assinatura Eletrônica

09/08/2021 14:06:56.0

MARIO ARTURO ACERO SANDOVAL
Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/07/2021 10:40:14.0

JOÃO ANTÔNIO CYRINO ZEQUI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Dedico este trabalho a todos os seres que foram e serão
afetados pela sua existência.

AGRADECIMENTOS

Gratidão ao Universo que por existir e permitir a vida.

Gratidão à minha família: à minha mãe, Jacira, por sempre me apoiar e estar presente; à minha irmã, Patrícia, por podermos compartilhar um tempo juntas e esquecer um pouco as preocupações; e ao meu pai, Afonso, que sempre me incentivou estudar, e sempre viverá no meu coração.

Gratidão ao meu amado, Fellip, por sempre estar presente, me apoiar nos momentos mais desafiadores, aquecer meu coração nos bons e maus momentos e por podermos evoluir juntos nessa caminhada.

Gratidão ao meu orientador, prof. Mário Navarro, por me acolher no laboratório, por me apoiar e acreditar em mim para a construção deste trabalho e me ensinar que esta jornada acadêmica, embora cheia de responsabilidades, deve ser agradável também.

Gratidão à minha co-orientadora, Angela Palacio, por todos os conhecimentos e conversas que compartilhou comigo neste tempo e por ter construído os alicerces para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Gratidão a todos que passaram pelo laboratório, pelos conhecimentos, histórias, sentimentos, choros e sorrisos compartilhados e pela companhia em forma de rodízio nestes dias de pandemia tão solitários.

Gratidão por todas as vidas que encontrei no laboratório, pelas ratinhas e mosquitos que doaram suas vidas para que este trabalho fosse realizado, em prol da saúde de muitas pessoas.

Gratidão a todos que, neste tempo, participaram do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Gratidão ao projeto “Inovação em produtos de controle e repelência do vetor e monitoramento de arbovírus” de Paranaguá, que tornou possível a realização deste trabalho.

Gratidão pelo apoio financeiro recebido para que esta pesquisa fosse realizada, especialmente ao CNPq.

Gratidão à banca avaliadora Dra. Renata da Rosa, Dr. Mario Arturo Acero Sandoval, Dr. João Antônio Cyrino Zequi e Luís Amilton Foerster que aceitaram o convite para colaborar com o desenvolvimento deste trabalho.

*"Planto algumas verduras no jardim.
Rego, olho e espero que cresçam.
Eu as observo, adubo, rego, projeto, mas não posso forçar a beterraba a crescer.
Não posso abrir as pétalas de um botão de flor.
Não posso forçar o casulo a abrir para ajudar a borboleta — ela precisa do esforço
para sair do casulo e voar livremente.
Espero.
Crio causas e condições favoráveis.
Aguardo.
Esse aguardar é sereno.
E por haver esperado, quando a mágica da vida acontece, há júbilo, gratidão e
alegria."*

Monja Coen Roshi

RESUMO

O *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) explora com sucesso o ecossistema urbano devido à antropofilia e é um vetor competente na transmissão de vírus para dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana levando a epidemias recorrentes. Quando medidas de monitoramento da atividade vetorial e redução de habitats para o desenvolvimento de imaturos falham, é necessário o uso de ferramentas como controle biológico e, por último, inseticidas para a redução da densidade populacional dos vetores. Este é um método limitado que apresenta toxicidade aos humanos e animais, leva à contaminação ambiental e seleciona os mosquitos resistentes ao princípio ativo. O monitoramento da resistência é realizado com o auxílio de técnicas como bioensaios e ferramentas moleculares, que auxiliam na determinação da suscetibilidade do vetor aos inseticidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de *A. aegypti* provenientes de Paranaguá (PR) utilizando a concentração discriminante (CD) estabelecida, bem como estudar a expressão gênica de enzimas relacionadas à resistência ao malation. Para isto, foi utilizado o método de bioensaios de suscetibilidade da OMS utilizando papéis impregnados com malation. A concentração discriminante foi estabelecida através de curva dose-resposta em concentrações entre 0,8 % e 3 % utilizando população suscetível *Rockefeller* mantida em insetário. A CD foi avaliada em mosquitos F2 procedentes de Paranaguá para obter o estado da resistência. A expressão gênica foi realizada após a transcrição reversa do RNA extraído de fêmeas sobreviventes à exposição na CD, fêmeas procedentes de campo sem exposição ao inseticida e fêmeas do insetário *Rockefeller*. Os genes estudados foram das enzimas acetilcolinesterase - AChE (*ace-1*), citocromo oxidase P₄₅₀ (*CYP6N12*) e esterase β (*CCEae3A*) e os genes referência foram proteína ribossomal S17 e actina. A expressão gênica foi estimada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A CD estabelecida foi de 3,41 % e a população de Paranaguá apresentou 66,5 % de mortalidade, sendo considerada resistente. Os níveis de expressão gênica da AChE e esterase β não apresentaram diferença significativa entre o grupo resistente e os controles, mas houve aumento significativo na expressão da P₄₅₀ no grupo resistente em relação ao controle não exposto. A CD obtida neste trabalho (3,41 %) foi superior à concentração recomendada pela OMS (0,8 %). A resistência ao malation foi evidenciada em uma população de *A. aegypti* de Paranaguá, apenas após três anos do uso deste inseticida e após a ocorrência de uma epidemia de dengue, que levou ao uso emergencial desta ferramenta. O aumento na expressão de um gene de P₄₅₀ pode estar relacionado à sua função biológica na bioativação do malation nas fêmeas expostas. Embora não tenha sido detectada alteração na expressão de esterase β , não é descartada sua participação na resistência, uma vez que o mecanismo mais comum relacionado ao malation é o aumento desta enzima. A AChE, entretanto, parece não participar da resistência observada uma vez que não houve alteração da expressão gênica e mutações são raras em *Aedes*. O uso intensivo do malation em Paranaguá, após a ocorrência de uma epidemia, levou à seleção de resistência a este inseticida, evidenciado pelos resultados obtidos.

Palavras-chave: Organofosforado. Citocromo oxidase P₄₅₀. Esterase β . Acetilcolinesterase. Paranaguá.

ABSTRACT

Aedes aegypti (Culicidae: Diptera) successfully exploits the urban ecosystem due to anthropophilia and is a competent vector in the transmission of viruses for dengue, Zika, Chikungunya and urban yellow fever leading to recurrent epidemics. When measures to monitor vector activity and habitat reduction for immature development fail, it is necessary to use tools such as biological control and, finally, insecticides to reduce vector population density. This is a limited method that presents toxicity to humans and animals, leads to environmental contamination and selects mosquitoes resistant to the active ingredient. Resistance monitoring is carried out with the help of techniques such as bioassays and molecular tools, which help to determine the vector's susceptibility to insecticides. The objective of this work was to evaluate the resistance of *A. aegypti* from Paranaguá (PR) using the established discriminant concentration (CD), as well as to study the gene expression of enzymes related to resistance to malathion. For this, the WHO susceptibility bioassay method using malathion-impregnated papers was used. The discriminant concentration was established through a dose-response curve at concentrations between 0,8 % and 3 % using a susceptible *Rockefeller* population kept in an insectary. CD was evaluated in F2 mosquitoes from Paranaguá to obtain the resistance status. Gene expression was performed after reverse transcription of RNA extracted from females surviving CD exposure, females from the field without exposure to the insecticide and females from the *Rockefeller* insectary. The genes studied were the enzymes acetylcholinesterase - AChE (*ace-1*), cytochrome oxidase P₄₅₀ (*CYP6N12*) and β esterase (*CCEae3A*) and the reference genes were ribosomal protein S17 and actin. Gene expression was estimated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The established DC was 3,41 % and the population of Paranaguá showed 66,5 % mortality, being considered resistant. The levels of gene expression of AChE and β esterase showed no significant difference between the resistant group and controls, but there was a significant increase in P450 expression in the resistant group compared to the unexposed control. The CD obtained in this work (3,41 %) was higher than the concentration recommended by the WHO (0,8 %). Malathion resistance was evidenced in a population of *A. aegypti* from Paranaguá, just three years after using this insecticide and after the occurrence of a dengue epidemic, which led to the emergency use of this tool. The increase in the expression of a P₄₅₀ gene may be related to its biological role in the bioactivation of malathion in exposed females. Although no alteration in the expression of β esterase was detected, its participation in resistance is not discarded, since the most common mechanism related to malathion is the increase of this enzyme. AChE, however, does not seem to participate in the resistance observed since there was no change in gene expression and mutations are rare in *Aedes*. The intensive use of malathion in Paranaguá, after the occurrence of an epidemic, led to the selection of resistance to this insecticide, as evidenced by the results obtained.

Keywords: Organophosphate. Cytochrome Oxidase P₄₅₀. β esterase. Acetylcholinesterase. Paranaguá.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO MALATION	26
FIGURA 2 – KIT DE BIOENSAIO COM PAPÉIS IMPREGNADOS, MODELO DA OMS	55
FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO DA CIDADE DE PARANAGUÁ	56
FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DAS ARMADILHAS OVITRAMPA	58
FIGURA 5 – ARMADILHA DE OVIPOSIÇÃO UTILIZADA EM CAMPO PARA OBTENÇÃO DE OVOS DE <i>Aedes</i>	59
FUGURA 6 – CURVA DE MORTALIDADE DE FÊMEAS <i>ROCKEFELLER</i> DE <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> QUANDO EXPOSTAS AO MALATION	73
FIGURA 7 – EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS ESTUDADAS	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – INSETICIDAS RECOMENDADOS PELA OMS PARA NEBULIZAÇÃO.....	28
TABELA 2 – CASOS DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA REGISTRADOS NA CIDADE DE PARANAGUÁ E INFESTAÇÃO PELO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> ENTRE OS ANOS DE 2008 E 2021	47
TABELA 3 – QUANTIDADE APROXIMADA DE REAGENTES UTILIZADOS PARA IMPREGNAÇÃO DOS PAPÉIS REFERENTES A CADA CONCENTRAÇÃO DE INSETICIDA, PARA TODOS OS BIOENSAIOS REALIZADOS	54
TABELA 4 – NÚMERO DE FÊMEAS EXPOSTAS EM CADA CONCENTRAÇÃO DE INSETICIDA PARA REALIZAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA	55
TABELA 5 – ORIGEM E REPRESENTATIVIDADE DE INDIVÍDUOS DE <i>Aedes aegypti</i> UTILIZADOS PARA ESTABELECIMENTO DE INSETÁRIO E OBTENÇÃO DA GERAÇÃO F1 E F2.....	60
TABELA 6 – INFORMAÇÕES SOBRE OS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA PCR EM TEMPO REAL	68
TABELA 7 – VALORES DE EFICIÊNCIA DE REAÇÃO E R ²	69
TABELA 8 – PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DAS FÊMEAS SUSCETÍVEIS DE <i>Aedes aegypti</i> EXPOSTAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MALATION PARA REALIZAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA	70
TABELA 9 – DADOS DA RESPOSTA DE FÊMEAS <i>ROCKEFELLER</i> DE <i>Aedes aegypti</i> ÀS CONCENTRAÇÕES LETAIS DE MALATION	70
TABELA 10 – RESULTADO DOS BIOENSAIOS COM AS POPULAÇÕES DE <i>Aedes aegypti</i> EXPOSTAS AO INSETICIDA MALATION UTILIZANDO A TÉCNICA DE PAPÉIS IMPREGNADOS DA OMS	72

LISTA DE SIGLAS

AChE	– Acetilcolinesterase
CD	– Concentração Discriminante
CDC	– Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	– DNA complementar
CYP	– Citocromo Oxidase P ₄₅₀
DDT	– Diclorodifeniltricloreto
DNase I	– Deoxyribonuclease I
EST	– Esterases
GST	– Glutathione-S-transferase
IB	– Índice de Breteau
IGR	– Inseticidas Reguladores de Crescimento
IIP	– Índice de Infestação Predial
ITR	– Índice de Tipos de Recipientes
mRNA	– RNA mensageiro
NCBI	– National Center for Biotechnology Information
OMS	– Organização Mundial da Saúde
P ₄₅₀	– Citocromo Oxidase P ₄₅₀
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
PNCD	– Programa Nacional de Controle da Dengue
qPCR	– Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SESA	– Secretaria da Saúde do Estado do Paraná
UBV	– Ultra Baixo Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 <i>Aedes aegypti</i> E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.....	16
2.2 MONITORAMENTO E CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i>	18
2.3 CONTROLE QUÍMICO DE CULICÍDEOS VETORES EM SAÚDE PÚBLICA ..	21
2.3.1 Organoclorados.....	22
2.3.2 Piretróides	23
2.3.3 Carbamatos.....	23
2.3.4 Neonicotinóides.....	24
2.3.5 Organofosforados.....	25
2.4 ADULTICIDAS RECOMENDADOS PELA OMS PARA USO EM SAÚDE PÚBLICA	27
2.5 INSETICIDAS USADOS PARA O CONTROLE DE CULICÍDEOS VETORES NO BRASIL	28
2.6 INSETICIDAS USADOS PARA CONTROLE DE CULICÍDEOS VETORES NO PARANÁ.....	31
2.7 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS	32
2.7.1 Mecanismos de resistência a inseticidas	33
2.8 ENZIMAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA.....	35
2.8.1 Monooxigenases	35
2.8.2 Esterases	37
2.8.3 Acetilcolinesterase	39
2.9 DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS	41
2.9.1 Bioensaios de suscetibilidade	41
2.9.2 Ferramentas moleculares para detecção de resistência	44
2.10 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CIDADE DE PARANAGUÁ.....	46

3 JUSTIFICATIVA.....	50
4. OBJETIVOS.....	51
4.1 OBJETIVO GERAL.....	51
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
5 MATERIAL E MÉTODOS	52
5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DOSE-RESPOSTA E CONCENTRAÇÃO DISCRIMINANTE	52
5.1.1 Insetário referência de <i>Aedes aegypti</i>	52
5.1.2 Curva dose-resposta e concentração discriminante.....	52
5.1.3 Impregnação dos papéis	53
5.1.4 Bioensaios com papel impregnado	54
5.2 BIOENSAIOS COM CONCENTRAÇÃO DISCRIMINANTE.....	56
5.2.1 Descrição do local de procedência de <i>Aedes aegypti</i>	56
5.2.2 Coleta do material	57
5.2.3 Obtenção de adultos	58
5.2.4 Impregnação dos papéis	62
5.2.5 Bioensaios com papel impregnado	63
5.2.6 Armazenamento das amostras	63
5.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	64
5.3.1 Extração de RNA.....	64
5.3.2 Quantificação das amostras de RNA	64
5.3.3 Avaliação de integridade do RNA	65
5.3.4 Tratamento das amostras	65
5.3.5 Elaboração de cDNA.....	66
5.3.6 Desenho dos iniciadores	66
5.3.7 Validação e otimização dos oligonucleotídeos.....	67
5.3.8 Eficiência de reação de qPCR	69

5.3.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qPCR)	70
5.3.10 Amostras destinadas para a expressão gênica	70
5.3.11 Análise dos resultados	70
6 RESULTADOS	72
6.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DOSE-RESPOSTA E CONCENTRAÇÃO DISCRIMINANTE	72
6.2 BIOENSAIOS COM POPULAÇÃO DE <i>Aedes aegypti</i> DE PARANAGUÁ	73
6.3 EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS EM INSETOS RESISTENTES	74
7 DISCUSSÃO	76
7.1 CONCENTRAÇÃO DISCRIMINANTE	76
7.2 RESISTÊNCIA AO MALATION	78
7.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA	82
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO I	105
ANEXO II	107

1 INTRODUÇÃO

Têm crescido anualmente no mundo casos de arboviroses transmitidas por vetores artrópodes, incluindo a dengue (WILSON et al., 2020). Cerca de quatro bilhões de pessoas estão em área de risco à infecção por dengue (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021) e no Brasil, apenas no ano de 2020 foram registrados 931.903 casos prováveis de dengue, tendo um histórico crescente de casos e eventos epidêmicos (ANDRIOLI; BUSATO; LUTINSKI, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). As epidemias de dengue se tornam mais frequentes no país a cada ano, bem como os períodos interepidêmicos têm sido cada vez menores (ANDRIOLI; BUSATO; LUTINSKI, 2020). As maiores epidemias de dengue registradas no país ocorreram neste século, sendo a maior em 2015, ano em que o município de Paranaguá, alvo deste estudo, também apresentou sua primeira e maior epidemia de dengue (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2016a; ANDRIOLI; BUSATO; LUTINSKI, 2020).

Estes dados são resultado de uma soma de fatores como o crescimento urbano desorganizado, a falta de infraestrutura nas cidades, precariedade de suprimento de água e destinação de resíduos, aumento do uso de embalagens não biodegradáveis e seu descarte no ambiente, que levam à criação de ambientes propícios ao desenvolvimento de vetores que transmitem agentes etiológicos, sendo que as populações com condições socioeconômicas mais precárias estão mais vulneráveis à infecção por arbovírus (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; WILSON et al., 2020;).

O controle de vetores tem sido a principal ferramenta pela qual ocorre a prevenção em relação a arboviroses, desde que seja precedido por planejamento adequado utilizando o princípio da sustentabilidade no tempo e espaço (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; WILSON et al., 2020). Entretanto o controle abrangente do vetor é confundido com o seu controle químico e intervenções com produtos químicos são valorizados em detrimento de ações preventivas (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; VALLE *et al.*, 2019). Desta forma, intensifica-se a pressão de seleção sobre os vetores culminando na resistência ao princípio ativo utilizado, bem como danos à saúde humana e animal e ao meio ambiente (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2014; VALLE *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2021).

Apenas no Brasil, a resistência a inseticidas já foi detectada para piretróides e organofosforados em nível nacional como resultado do uso excessivo de inseticidas em resposta proporcional à abrangência de epidemias de dengue (VALLE et al., 2019; CAMPOS et al., 2020). Entretanto as alternativas de princípios ativos são limitadas e o uso racional de inseticidas, bem como o monitoramento adequado são fundamentais para que esta ferramenta continue sendo útil ao controle de vetores em situações emergenciais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010, 2020).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aedes aegypti* E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

O *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) (HUTCHINGS; SALLUM; HUTCHINGS, 2021) é um mosquito cosmopolita, originário da África e identificado pela primeira vez no Egito, mas que atualmente apresenta distribuição em áreas tropicais e subtropicais do mundo devido à dispersão passiva causada pela sua intrínseca relação com a espécie humana (GUBLER, 1998; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; WALTER REED BIOSYSTEMATICS UNIT, 2021). No Brasil, é reconhecido que esta espécie tenha sido inserida pela primeira vez através do tráfego marítimo decorrente de pessoas capturadas e escravizadas vindas da África, no período colonial (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Acredita-se que ocorreram dois eventos de erradicação de *A. aegypti* no país, em 1955 e 1973. Após poucos anos, 1967 e 1976 respectivamente, a espécie foi reintroduzida por meio do tráfego de mercadorias e pessoas de outros países da América (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 1999; LIMA et al., 2003; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; VALLE et al., 2019).

A. aegypti é uma espécie antropofílica, adaptada a viver em áreas urbanas, onde as fêmeas utilizam, para a oviposição, depósitos de água armazenada e recipientes que acumulem água como embalagens plásticas, pneus e outros descartes, abundantes na área urbana, vivendo próximos às residências, em locais com maior aglomeração de pessoas (GUBLER, 1998; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Apresentam metamorfose completa, sendo o ciclo de vida: ovo, quatro ínstares

larvais, pupa e adulto (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Os mosquitos adultos de *A. aegypti* são escuros, apresentam faixas pretas e brancas nas pernas dando-lhes um aspecto listrado e são identificados pelo padrão de escamas branco-prateadas em forma de lira, presentes no escudo torácico (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

Machos e fêmeas adultos, se alimentam de açúcares de plantas, entretanto as fêmeas necessitam de uma alimentação proteica para que ocorra o desenvolvimento completo dos ovários e a maturação dos ovos, que é obtida através do sangue de vertebrados (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). As fêmeas alimentam-se preferencialmente de sangue humano, uma vez que sua composição bioquímica favorece o aumento do valor adaptativo individual (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001) de forma que esta espécie coexiste e acompanha a espécie humana, que favorece sua proliferação, num processo coevolutivo (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Assim, são considerados eficientes transmissores de patógenos, sendo atualmente responsáveis pela transmissão do vírus da dengue, Zika vírus, febre chikungunya e febre amarela urbana (WEAVER; LECUIT, 2015; BOGOCH et al., 2016; KANTOR, 2016; COUTO-LIMA et al., 2017).

No mundo, são estimadas cerca de 390 milhões de infecções anualmente pelo vírus da dengue, causando a morte de uma pessoa a cada 12 minutos e sendo uma das principais causas de mortes de crianças na Ásia e América Latina (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Cerca de quatro bilhões de pessoas em 128 países, aproximadamente metade da população mundial, estão em risco de serem infectadas e contraírem a dengue ou dengue grave e nas Américas 500 milhões de pessoas estão em risco (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil, apenas no ano de 2020 foram registrados 931.903 casos prováveis de dengue, sendo a maior incidência no Centro-Oeste seguido pela região Sul com maior contribuição do estado do Paraná. Também foram notificados 71.698 casos prováveis de chikungunya e 6.705 de Zika vírus no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Atualmente há vacinas eficientes apenas para a febre amarela, enquanto para a dengue a única vacina já disponível apresenta eficácia de 59 % e ainda não estão disponíveis de forma abrangente, entretanto novas vacinas têm sido desenvolvidas

para a dengue (KANTOR, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Também não há tratamentos específicos para estas doenças e, dessa forma, a melhor forma de prevenção tem sido o controle mecânico, biológico e químico do vetor para redução da sua densidade e bloqueio de epidemias (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2014; VALLE *et al.*, 2019).

2.2 MONITORAMENTO E CONTROLE DE *Aedes aegypti*

A presença do *A. aegypti* ocorre por uma soma de fatores que dependem da própria estrutura urbana, onde não há coleta e destinação adequada de resíduos sólidos, abastecimento regular de água, as condições sanitárias são precárias e há aumento do uso de embalagens não biodegradáveis com seu descarte sendo realizado no ambiente (SILVA; MARIANO; SCOPEL, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Cerca de 80 % da população brasileira vive em áreas urbanas, sujeitas a estas falhas estruturais, favoráveis ao desenvolvimento do vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Da mesma forma, o controle do vetor é uma atividade complexa que independe apenas do setor da Saúde, sendo necessárias mudanças estruturais como amplo saneamento, coleta de resíduos sólidos, fornecimento constante de água e participação ampla da sociedade para a eliminação de criadouros que, muitas vezes são internos às propriedades (PENNA, 2003; VALLE *et al.*, 2019). Além disso, a situação atual da distribuição de *A. aegypti* também é resultado de políticas públicas que não priorizaram medidas preventivas que pudessem inviabilizar a presença do vetor e/ou ampliação da densidade vetorial (PENNA, 2003).

O sucesso no controle de vetores de importância para a Saúde Pública depende primordialmente de vigilância epidemiológica e entomológica e do monitoramento da resistência a inseticidas (BRAGA; VALLE, 2007a). A sua função primordial é a prevenção, a fim de evitar infecções através do bloqueio de transmissão e tem como objetivo prevenir e manejar problemas como surtos, epidemias e reintrodução de doenças e reduzir os fatores de risco ambiental para a transmissão de arboviroses (BRAGA; VALLE, 2007b). Para isto, os métodos preventivos devem ser prioritários no controle de vetores pela sua eficiência e menor custo ambiental. Estes métodos são compostos por ações educativas, controle mecânico, apoio da legislação, controle biológico, manejo e, mais atualmente, por métodos mais seletivos,

naturais e com apoio da biotecnologia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ZARA *et al.*, 2016).

A vigilância epidemiológica consiste na rápida notificação de casos de arboviroses, como a dengue, registradas nas unidades básicas de saúde dos municípios, como medida de acompanhamento da transmissão e curva endêmica das doenças para ações rápidas de prevenção e controle. Segundo a portaria GM/MS nº 5 de 21 de fevereiro de 2006, a dengue é uma doença de agravo de notificação compulsória, devendo todos os casos suspeitos, confirmados ou não, serem notificados à Vigilância Epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A vigilância entomológica consiste no registro constante da densidade vetorial em uma área urbana, bem como a obtenção de informações sobre o vetor como suas características ecológicas, distribuição geográfica, grau de infestação e criadouros preferenciais para nortear ações de controle (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A vigilância é realizada através da coleta de ovos, larvas e pupas ou adultos de *A. aegypti*, cada qual com uma finalidade específica, sendo mais utilizadas as coletas de larvas para levantamento da densidade vetorial e de ovos para estimar a atividade de postura, presença e abundância do vetor (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; BRAGA; VALLE, 2007a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A coleta destes dados permite a realização de estimativas de índices entomológicos que indicam a situação de infestação através da utilização de índices como o Índice de Infestação Predial (IIP), Índice de Tipos de Recipientes (ITR) e Índice de Breteau (IB), entre outros, que servem como suporte para direcionar ações de controle (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Ações educativas são fundamentais para o sucesso de campanhas de controle de vetores, de forma que a comunidade e os gestores sejam sensibilizados para manter os espaços privados e públicos sem a presença de criadouros através do descarte adequado de resíduos e realizando a vigilância entomológica (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2014). Se por um lado, o enfrentamento do vetor pela população é o maior aliado das ações preventivas, por outro lado, a comunicação transparente com a população deve ser valorizada e priorizada pelas autoridades, permitindo o livre trânsito de informações claras, precisas e atualizadas sobre a melhor forma de realizar ações de controle que sejam de sua responsabilidade, bem como os indicadores da atividade vetorial e número de casos (PENNA, 2003).

O controle mecânico consiste de técnicas que impedem a procriação dos mosquitos, eliminando criadouros e dando-lhes um destino adequado, sendo coordenado pelo poder público. Atividades mais abrangentes podem ser realizadas em nível municipal, como reforço de coleta de resíduos sólidos e destinação correta, vedação de depósitos de água e destino adequado de pneumáticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). O sucesso do controle mecânico como ação preventiva depende de muito trabalho, investimento, atenção e tempo e, embora campanhas sejam realizadas para que ocorra a remoção de criadouros, é necessário o investimento em recursos humanos e estrutura na totalidade dos municípios do país (SILVA; MARIANO; SCOPEL, 2008; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2014;).

Em adição a isto, métodos mais seletivos e naturais com vantagens e desvantagens específicas, têm sido desenvolvidos para auxiliar no controle do vetor. São eles: abordagem eco-bio-social que leva à participação social no controle mecânico do vetor; mapeamento de risco com ações específicas em áreas críticas; uso de compostos naturais com atividade larvicida; uso de mosquitos dispersores de inseticida; mosquitos transgênicos que apresentem genes letais ou com potencial reduzido para a transmissão de arbovírus; esterilização por irradiação; e utilização de *Wolbachia*, uma bactéria que promove esterilização e redução da transmissão viral (ZARA *et al.*, 2016). Por último, o controle biológico tem o potencial de reduzir a densidade vetorial utilizando agentes biológicos. Estes podem ser patógenos como bactérias, fungos e parasitas ou predadores como peixes e outros invertebrados que se alimentam de mosquitos (BRAGA; VALLE, 2007a; ZARA *et al.*, 2016). Atualmente não há, entretanto, uma forma única de controle vetorial, sendo a utilização de mais de um método necessária para reduzir a densidade vetorial e a transmissão de arbovirose, levando-se em conta as necessidades regionais e tecnologias disponíveis dentro de um manejo integrado (ZARA *et al.*, 2016).

Por último, quando medidas preventivas não são valorizadas e a densidade vetorial atinge níveis de risco a ocorrência de epidemias, é necessária a utilização do controle químico para redução populacional de larvas e adultos do vetor. O Ministério da Saúde é responsável pela escolha de inseticidas para uso em saúde pública, segundo a Portaria MS/GM nº 1.172/2004, e é baseada nos produtos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Inseticidas residuais e para controle larval podem ser utilizados rotineiramente de forma complementar ao controle mecânico em

situações específicas, entretanto a utilização de inseticida Ultra Baixo Volume (UBV) em veículo acoplado é utilizado apenas para bloqueio de transmissão e controle de surtos e epidemias para reduzir a densidade vetorial rapidamente e, consecutivamente, a transmissão de arboviroses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Um ponto importante, é que o uso de inseticidas não resulta no controle dos vetores, apenas na redução temporária da densidade vetorial (PENNA, 2003). Entretanto gestores e a população confundem controle do vetor com controle químico, tornando o uso de inseticidas o método mais popular e que cria sensação de segurança, levando ao aumento da pressão de seleção sobre os vetores e culminando na resistência ao princípio ativo utilizado, bem como danos à saúde humana e animal e ao meio ambiente (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2014; VALLE *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2021).

O monitoramento de alterações na suscetibilidade aos inseticidas utilizados no controle químico de vetores deve ser realizado para garantir sua eficácia, uma vez que são poucas as alternativas de princípios ativos inseticidas (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; BRAGA; VALLE, 2007a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Deste modo, detectada a resistência, é possível realizar o manejo do inseticida o mais breve possível e definir novas estratégias de controle a fim de garantir a viabilidade desta ferramenta (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; BRAGA; VALLE, 2007a). O monitoramento da resistência é realizado através da detecção de alterações na suscetibilidade a um inseticida utilizando ensaios biológicos para detectar alterações nas taxas de mortalidade e ensaios bioquímicos e moleculares para determinar os mecanismos envolvidos na resistência (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; BRAGA; VALLE, 2007a).

2.3 CONTROLE QUÍMICO DE CULICÍDEOS VETORES EM SAÚDE PÚBLICA

Inseticidas são compostos orgânicos ou inorgânicos de origem sintética ou natural que causam a morte ou alterações no desenvolvimento de insetos (WARE; WHITACRE, 2004). Compõem um inseticida os ingredientes ativos e ingredientes inertes. O ingrediente ativo é a substância química que geralmente causa o efeito tóxico podendo um inseticida ser composto por um ou mais ingredientes ativos, enquanto o ingrediente inerte é a substância que tem a finalidade de diluir o ingrediente ativo, manter sua estabilidade, facilitar dispersão e/ou penetração nos

organismos alvo (SCHIESARI, 2012). Podem ocorrer várias formulações de um mesmo ingrediente ativo, entretanto com variação da sua concentração ou com diferentes ingredientes inertes, compondo diferentes produtos inseticidas, mas com mesmo mecanismo de ação (SCHIESARI, 2012).

As quatro maiores classes de inseticidas tradicionalmente citadas como sendo utilizadas para o controle químico de vetores e insetos praga são os organoclorados, piretróides, carbamatos e organofosforados (BRAGA; VALLE, 2007b). Entretanto, os organoclorados não são mais utilizados pela maioria dos países e, recentemente, um inseticida da classe dos neonicotinóides passou a ser utilizado para controle de vetores na sua fase adulta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019, 2020).

2.3.1 Organoclorados

Inseticidas organoclorados contêm carbono, hidrogênio e cloro em sua composição (WARE; WHITACRE, 2004). Eles atuam nos canais de sódio das membranas neuronais, mantendo-os abertos e impossibilitando o equilíbrio de íons sódio e potássio nos axônios e, com isso, impedem a transmissão de impulsos nervosos (WARE; WHITACRE, 2004).

O diclorodifeniltricloreto (DDT) é o inseticida mais conhecido desta classe, desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, foi muito utilizado no século passado para o controle de vetores dos patógenos da malária e febre amarela, sendo relevante no sentido histórico por ser o primeiro inseticida químico utilizado em larga escala, eficiente para sua função e econômico (FERRER, 2003; WARE; WHITACRE, 2004). Porém, devido à alta estabilidade da sua molécula química, levando a um grande potencial bioacumulativo nos tecidos animais e persistência no ambiente, foi proibida sua utilização em vários países (CHEN; ROGAN, 2003; FERRER, 2003). Por ser lipofílico, o DDT acumula-se no tecido adiposo e altera a atividade hormonal, sendo seu uso também associado ao aumento de nascimentos prematuros, redução do tempo de lactação, aumento de mortalidade infantil e desenvolvimento de câncer (CHEN; ROGAN, 2003; FERRER, 2003; WALISZEWSKI *et al.*, 2003). Entretanto seu uso ainda ocorre, sobretudo em países que não têm condições financeiras de adquirir outros inseticidas ou nos quais foi selecionada a resistência a outras classes de inseticidas nos vetores de malária e leishmanioses, como em Países da África e na Índia (VAN DEN BERG; MANUWEERA; KONRADSEN, 2017). No Brasil, também

houve a proibição do uso, fabricação, importação, exportação e manutenção em estoque do inseticida DDT, em resposta à lei nº 11.936 de 14 de maio de 2009, que considerou que sua utilização ocasionaria a poluição do ambiente e riscos à população humana e animal (BRASIL, 2009).

2.3.2 Piretróides

Piretróides sintéticos são inseticidas derivados de piretrinas naturais identificadas em crisântemos (BRAGA; VALLE, 2007a). Estas, entretanto, não são comumente utilizadas devido ao alto custo e baixa estabilidade em exposição à luz solar, enquanto as formas sintéticas, ao contrário, são estáveis à luz solar e eficientes para o controle de pragas e vêm sendo amplamente utilizadas (WARE; WHITACRE, 2004). O modo de ação desta classe de inseticidas é similar ao dos organoclorados, mantendo os canais de sódio abertos nos neurônios, desregulando o equilíbrio de íons. Eles atuam no sistema nervoso central e periférico dos insetos, estimulando os neurônios a realizar descargas repetitivas levando à paralisia, sendo estes efeitos mais intensos nesta classe do que aos organoclorados (FERRER, 2003; WARE; WHITACRE, 2004).

Piretróides são biodegradáveis, não têm potencial bioacumulativo e, embora sejam altamente tóxicos à fauna aquática, são considerados de baixa toxicidade para mamíferos e aves de forma que raramente causam graves intoxicações, provavelmente devido à necessidade de as moléculas serem ativas por hidrólise, mas sendo fracos indutores de enzimas (FERRER, 2003; BRAGA; VALLE, 2007a). Devido a estas características, são os inseticidas com o maior nível de utilização doméstica, tendo substituído quase todos os demais e sendo facilmente encontrado em mercados para o controle de insetos nos domicílios (FERRER, 2003; VALLE *et al.*, 2019).

2.3.3 Carbamatos

Carbamatos são inseticidas derivados de ácido carbâmico e atuam através da inibição da acetilcolinesterase nas sinapses nervosas tornando a enzima carbamilada e rapidamente tendo efeito letal sobre os insetos (FERRER, 2003; WARE; WHITACRE, 2004; BRAGA; VALLE, 2007a). Entretanto esta ligação é reversível,

tornando esta classe de inseticidas de baixa toxicidade a vertebrados, diferentemente dos organofosforados que têm mecanismo de ação similar (FERRER, 2003; WARE; WHITACRE, 2004). Além disso, os carbamatos são potenciais inibidores de aliesterases, cujas funções são pouco conhecidas, têm maior seletividade a colinesterases de algumas espécies e não possuem potencial bioacumulativo (FERRER, 2003; WARE; WHITACRE, 2004).

2.3.4 Neonicotinóides

Os neonicotinóides são inseticidas mais recentes, liberados na década de 1990, e, similarmente aos piretróides, são substâncias sintéticas, porém derivados de nicotina natural extraída do tabaco, *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) (WARE; WHITACRE, 2004; SEIFERT, 2005). Diferentemente da nicotina, que é mais tóxico aos mamíferos do que a insetos, os neonicotinóides sintéticos têm um alto grau de seletividade em relação aos insetos devido à maior afinidade com os receptores no sistema nervoso central de insetos e pouca afinidade com os receptores de mamíferos (SEIFERT, 2005). Estes inseticidas são sistêmicos e atuam através de contato e ingestão, sendo muito utilizados para insetos sugadores de plantas de interesse agrícola. Seu modo de ação ocorre através do bloqueio irreversível dos receptores nicotínicos de acetilcolina nos neurônios pós-sinápticos, no sistema nervoso central (WARE; WHITACRE, 2004; SEIFERT, 2005).

Esta classe é considerada segura para humanos e vertebrados, não tendo demonstrado potencial mutagênico, teratogênico, neurotóxico e nem toxicidade reprodutiva em testes laboratoriais (SEIFERT, 2005). Embora sua segurança ambiental supere a de outros inseticidas, devido à sua seletividade para receptores nicotínicos de insetos, são tóxicos para artrópodes aquáticos e terrestres não alvo, como abelhas, sendo atualmente considerado responsável por afetar suas populações e seu comportamento (SEIFERT, 2005; MUTH; LEONARD, 2019; SALEEM; HUANG; MILBRATH, 2020).

2.3.5 Organofosforados

Organofosforados incluem os inseticidas que contêm essencialmente ésteres de fósforo em sua composição, associados a diversas combinações de oxigênio, carbono, enxofre ou nitrogênio. Esta classe é subdividida em três grupos: alifáticos, que contêm carbono em sua estrutura; derivados de fenil, que apresentam um anel de fenil, são mais estáveis e seus resíduos têm maior durabilidade; e os heterocíclicos, também possuem um anel de fenil, mas apresentam oxigênio, nitrogênio ou enxofre (WARE; WHITACRE, 2004). O modo de ação dos organofosforados é através da fosforilação da enzima acetilcolinesterase nas sinapses nervosas causando sua inibição permanente, uma vez que esta ligação é irreversível (WARE; WHITACRE, 2004; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). Desta forma, a acetilcolina não pode sofrer hidrólise pela enzima e acumula-se nas junções nervosas, estimulando continuamente os receptores no neurônio pós sináptico, impedindo a interrupção do impulso nervoso, ocasionando contração rápida dos músculos involuntários, paralisia e morte (WARE; WHITACRE, 2004; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

Os inseticidas desta classe são lipossolúveis, permitindo que ocorra uma rápida dispersão dos princípios ativos no organismo, entretanto os eficientes processos de biotransformação permitem que não ocorra sua acumulação em gorduras (FERRER, 2003). São, também, considerados os inseticidas mais tóxicos para os vertebrados, entretanto a maioria é quimicamente instável e pouco persistente no ambiente, e foram considerados os substitutos adequados aos organoclorados, como o DDT na década de 1970, que têm alta persistência ambiental (WARE; WHITACRE, 2004).

2.3.5.1 Malation

O malation foi o primeiro inseticida a fazer parte do Programa da OMS para Avaliação e Teste de Novos Inseticidas em 1960 (WHOPES), programa criado com a finalidade de desenvolver novos inseticidas devido à contaminação ambiental, bioacumulação e aparecimento de populações resistentes ao DDT, utilizado em larga escala (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Em 1960, após a avaliação do malation para o controle da malária, foi considerado adequado para uso em

campanhas de erradicação de mosquitos *Anopheles Meigan* 1818, substituindo o DDT (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O malation (*S*-1,2-bis (ethoxycarbonyl) ethyl, *O*-dimethyl phosphorodithioate/ fórmula molecular: C₁₀H₁₉O₆PS₂) (FIGURA 1), éster de ácido fosfórico, é um composto alifático de cadeia aberta. É utilizado na agropecuária para controlar insetos pragas de plantas, gado e produtos armazenados e amplamente em saúde pública para controle de insetos vetores de doenças como malária e dengue (WARE; WHITACRE, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

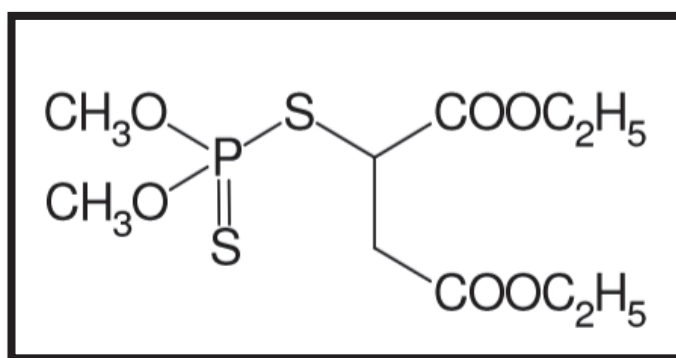


FIGURA 1. FÓRMULA ESTRUTURAL DO MALATION
FONTE: (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004)

O ingresso do malation ao inseto é realizado por via de contato ou ingestão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). Após sua absorção, o malation necessita ser bioativado no organismo por monooxigenases, que realizam sua transformação ao malaoxon, sua forma mais tóxica (FEYEREISEN, 1999; SCOTT, 1999; HEMINGWAY *et al.*, 2004). No organismo, é o malaoxon que interage com as esterases como sua enzima alvo, a acetilcolinesterase, realizando sua fosforilação permanente e inibindo-a, impedindo sua função neuronal (FEYEREISEN, 1999; SCOTT, 1999; HEMINGWAY *et al.*, 2004; WARE; WHITACRE, 2004).

A utilização do malation em saúde pública era feita na forma de emulsão aquosa (EW), sendo recomendado para pulverização em ambientes externos através de nebulização UBV, o “fumacê” tendo como alvo o estágio adulto do vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). No Brasil, a entrega de partículas de aerossóis de inseticida deve ser usada apenas para bloqueio de transmissão e controle de surtos e epidemias. Para impactar as populações e transmissão de patógenos, o inseticida deve ser lançado em ciclos de cinco aplicações em ciclos de três a cinco dias sem

ultrapassar cinco a sete vezes por ano e em associação com ações de remoção de criadouros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Entretanto, na prática, os ciclos de aplicação não são respeitados, sendo utilizados mais ciclos do que o recomendado uma vez que há recorrência de epidemias (LEANDRO *et al.*, 2020) e a distribuição heterogênea de períodos epidêmicos pode causar pressão de seleção diferencial entre diferentes localidades no país colaborando para a seleção de resistência nos vetores em nível nacional (CAMPOS *et al.*, 2020).

2.4 ADULTICIDAS RECOMENDADOS PELA OMS PARA USO EM SAÚDE PÚBLICA

A OMS preconiza os princípios ativos que podem ser utilizados na área urbana, as concentrações e tipos de tratamento seguindo normas técnicas e operacionais de especialistas em praguicidas. A lista de inseticidas recomendados pela OMS para uso em saúde pública no controle químico de vetores foi atualizada pela última vez em janeiro de 2020 e apresenta todos os compostos que podem ser utilizados atualmente. Integra a lista, inseticidas que atingem a fase adulta dos vetores como *spray* residual interno, redes impregnadas de efeito duradouro ou rápido e nebulização espacial e, para as fases imaturas, os larvicidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). A TABELA 1 apresenta os princípios ativos, modo de ação no organismo e classe à qual pertencem os inseticidas utilizados para nebulização espacial.

No Brasil, a nebulização espacial é realizada através da aplicação UBV, chamada “*fumacê*” e tem o objetivo de eliminar adultos de *A. aegypti* em ações de bloqueio de transmissão e controle de surtos e epidemias. O equipamento libera aerossóis, pequenas partículas de inseticida (10 µm a 25 µm) que devem ter capacidade de eliminar um mosquito adulto. O Ministério da Saúde é o responsável pela obtenção de inseticidas para uso em saúde pública, recomendados pela OMS, sustentado pela Portaria MS/GM nº 1.172/2004 que proíbe aquisição direta pelos municípios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

TABELA 1. INSETICIDAS RECOMENDADOS PELA OMS PARA NEBULIZAÇÃO

Ingrediente Ativo	Ação	Classe
d,d transcifenotrina	Canais de sódio na membrana neuronal	Piretróide
Deltametrina	Canais de sódio na membrana neuronal	Piretróide
Lambda-cialotrina	Canais de sódio na membrana neuronal	Piretróide
Malation	Fenda sináptica, inibidor de Acetilcolinesterase	Organofosforado
Pralettrina+Imidacloprida	Canais de sódio e receptores nicotinérgicos	Piretróide+Neonicotinóide
S-Bioaletrina, Permetrina e Piperonyl Butoxide	Canais de sódio na membrana neuronal	Piretróide

FONTE: (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020)

2.5 INSETICIDAS USADOS PARA O CONTROLE DE CULICÍDEOS VETORES NO BRASIL

O uso de inseticidas químicos para controle de insetos vetores no Brasil começou em 1939 com a campanha de erradicação de *Anopheles gambiae* Giles 1926 (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Entretanto o controle de *A. aegypti* começou apenas em 1947 sendo utilizado o inseticida DDT, que propiciou a sua primeira erradicação, em 1955. Em 1967 ocorreu sua reintrodução no país e, em decorrência da resistência ao DDT, o temefós passou a ser utilizado para seu controle, que possibilitou a segunda erradicação em 1973 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 1999; LIMA *et al.*, 2003; VALLE *et al.*, 2019).

Em 1976 ocorreu a última reintrodução de *A. aegypti* no Brasil através do porto de Salvador, de onde se dispersou por todos os estados do país (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 1999). A partir de então, passaram a ser utilizados organofosforados para larvas e adultos intensificando o uso de produtos químicos após a epidemia de dengue em 1986 no Rio de Janeiro, quando a dengue passou a ser um problema nacional. Até então o uso de inseticidas era esporádico, mas passou a ser utilizado periodicamente no controle de vetores para evitar novas epidemias (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; VALLE *et al.*, 2019).

Apesar da ampla distribuição de *A. aegypti* no Brasil, os programas de controle do vetor ainda priorizam pouco as ações integradas de controle como medidas sanitárias, remoção de criadouros, educação e participação da comunidade (VALLE

et al., 2019). Além disso, o levantamento de índices entomológicos, preconizado pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), não ocorre de forma eficiente, levando à implementação da última alternativa de controle, que é o uso de inseticidas de síntese orgânica. Desta forma, o controle de vetores foi e continua sendo fortemente baseado no controle químico com inseticidas direcionados a larvas e adultos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 1996; MACORIS *et al.*, 2007).

O Ministério da Saúde preconiza os inseticidas que serão utilizados pelos estados no controle do vetor, baseando-se na lista de inseticidas recomendados pela OMS (BELLINATO *et al.*, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Entretanto, apesar do histórico de inseticidas ser predominantemente o mesmo em todos os estados (MACORIS *et al.*, 2007), as substituições de inseticidas não foram sincrônicas e cada estado teve suas particularidades quanto à resistência das populações do vetor e tempo para a substituição. Portanto o uso de inseticidas utilizados no Brasil não foi homogêneo, mas segue uma ordem de substituição à medida que a detecção de resistência nas populações foi sendo relatada (VALLE *et al.*, 2019).

O organofosforado empregado para o controle de larvas foi o temefós que começou a ser utilizado no Brasil a partir de 1967 quando o *A. aegypti* foi reintroduzido no país e propiciou o segundo evento de erradicação do vetor em 1973. Após sua última reintrodução, em 1976, este larvicida continuou sendo utilizado e à medida que o vetor se dispersava pelo país, especialmente após 1980, passou a ser integrante do controle de vetores em todos os estados. Após observação de populações com elevados níveis de resistência, a partir de 2000 o biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelenses* - Bti foi também introduzido no controle de vetores nos municípios onde se detectou resistência ao temefós (LIMA *et al.*, 2003; MACORIS *et al.*, 2018; VALLE *et al.*, 2019). No entanto, apenas em 2012 recomendou-se definitivamente a interrupção do seu uso e a partir de 2014 não foi mais utilizado. A partir de 2009/2010 passaram a ser utilizados os inseticidas reguladores de crescimento (IGR) da classe de inibidores de síntese de quitina diflubenzuron e novarulon. Entretanto, a partir de 2014, foram substituídos pelo também IGR análogo de hormônio juvenil pyriproxyfen. (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; VALLE *et al.*, 2019).

O controle químico do vetor na fase adulta disponibilizados tanto de forma residual quanto em nebulização UBV foi realizado utilizando os organofosforados

fenitrothion e malation. Embora ambos fossem utilizados desde a reintrodução de *A. aegypti* em 1976 de forma esporádica, apenas de 1985 a 1999 foram utilizados de forma abrangente no país. Neste período, o malation também foi usado de forma esporádica para tratamento residual (MACORIS, 2002; LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 2007;). Após três décadas de utilização de organofosforados e com a evidente diminuição da sua eficácia em decorrência da seleção de populações resistentes no país (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015), a partir de 1999 passou a ser utilizada outra classe de inseticida, o piretróide cipermetrina (MACORIS, 2002; MACORIS et al., 2007; VALLE et al., 2019).

Com o uso intensivo de piretróides no controle de vetores, tanto de *A. aegypti* como no controle dos responsáveis pela transmissão dos agentes etiológicos da doença de chagas, malária e leishmaniose em vários locais do país, associado ao uso doméstico, a pressão com o inseticida alterou rapidamente a suscetibilidade das populações de mosquitos. Em poucos anos as populações do vetor já apresentavam indícios de seleção de resistência de forma que populações coletadas em 2001, 2002 e 2003 já não eram mais suscetíveis e este cenário foi se deteriorando com o passar dos anos (DA-CUNHA et al., 2005; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; VALLE et al., 2019). O monitoramento da resistência nos anos seguintes indicavam a disseminação e aumento dos níveis de resistência nas populações do *A. aegypti* no Brasil, um indício da forte pressão de seleção sobre os princípios ativos piretróides (MARTINS et al., 2009; VALLE et al., 2019).

Com as populações de *A. aegypti* resistentes aos piretróides em todo o Brasil (IOC/FIOCRUZ, 2011), em 2009 o Ministério da Saúde recomendou a sua substituição pela única alternativa a essa classe, o organofosforado malation usado até dez anos antes, que passou a ser novamente introduzido no controle de vetores adultos. Apesar do uso pontual entre 2006 e 2008 no Ceará, Rio de Janeiro e Minas Gerais, seu uso foi estabelecido no país entre 2009 e 2011 e o piretróide deltametrina ainda continuou a ser utilizado esporadicamente até 2014 (IOC/FIOCRUZ, 2016; VALLE et al., 2019).

Mais recentemente, entre 2017 e 2018, foi avaliada a suscetibilidade de *A. aegypti* aos inseticidas utilizados no controle do vetor a partir de 2012. A resistência ao adulticida malation foi detectada em todo o território nacional e ao larvicida pyriproxyfen apenas nos estados do Nordeste. Concomitantemente foi detectada também a permanência dos marcadores de resistência aos piretróides, não utilizados nos programas de controle do vetor desde 2012. Desta forma, o Ministério da Saúde

elegeu, junto a especialistas, novos inseticidas preconizados pela OMS para promover o controle químico de vetores. Priorizou-se larvicida biológico e adulticida com diferente mecanismo de ação dos utilizados anteriormente, uma vez que as populações de mosquitos do Brasil apresentaram indícios de resistência a piretróides e organofosforados. Foram escolhidos o larvicida biológico com ação tóxica de *Saccharopolyspora spinosa*, adulticida residual Clotianidina+Deltametrina e adulticida espacial UBV Praletrina+Imidacloprida (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

Frente a isto, o Ministério da Saúde ainda reforçou a necessidade de utilizar o controle químico racionalmente e em situações específicas priorizando medidas preventivas como controle mecânico, biológico e legal (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019). Uma vez que as alternativas de princípios ativos são limitadas, a resistência das populações do vetor a organofosforados e piretróides limitando as possibilidades de substituição por outra classe e o processo de obtenção de novos princípios ativos é complexo e demanda anos de estudos para aprovação, o uso racional de inseticidas é fundamental para que esta ferramenta continue sendo útil ao controle de vetores em situações emergenciais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010, 2020).

2.6 INSETICIDAS USADOS PARA CONTROLE DE CULICÍDEOS VETORES NO PARANÁ

O controle químico de culicídeos vetores na região Sul começou apenas em 2003 quando todos os estados receberam o larvicida temefós continuamente entre 2003 e 2014 e, no Paraná, até 2013. O Rio Grande do Sul também recebeu suprimento de biolarvicida Bti em 2006 e 2009. Larvicidas IGR começaram a ser utilizados no Paraná a partir de 2010 e nos demais estados da região em 2014. A partir de 2009/2010 foram utilizados diflubenzuron e novarulon e em 2014 foi introduzido o pyriproxyfen. (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; VALLE *et al.*, 2019).

O controle químico de adultos foi realizado apenas com piretróides no Sul, fornecidos de 2003 a 2014. No Paraná, apenas no ano de 2007 não foi fornecido

piretróides e a partir de 2010 passou a receber também o organofosforado malation (VALLE *et al.*, 2019).

Assim como descrito anteriormente, após a avaliação, em 2017 e 2018, da suscetibilidade aos inseticidas utilizados, foi detectada resistência ao malation em todo o país, inclusive no Paraná (CAMPOS *et al.*, 2020; LEANDRO *et al.*, 2020), assim como aos piretróides (VALLE *et al.*, 2019). Desta forma, o Ministério da Saúde elegeu em 2019 novos inseticidas preconizados pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020) para o controle químico do vetor: o larvicida biológico com ação tóxica de *Saccharopolyspora spinosa*, aduicida residual Clotianidina+Deltamentrina e aduicida espacial UBV Praetrina+Imidacloprida. Desde fevereiro de 2020, o inseticida espacial UBV Cielo® (Praetrina + Imidacloprida) substituiu malation nas ações de controle no Paraná, assim como em Paranaguá (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2019; GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2020).

2.7 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

A resistência a inseticidas é caracterizada por uma rápida evolução sob uma forte pressão de seleção que ocorre em populações abundantes com ciclos de vida curtos (MALLET, 1989; MCCAFFERY; NAUEN, 2006). Pode ser definida como alterações hereditárias na suscetibilidade de uma população a um inseticida de forma que seu uso cause falhas ao controle de insetos (MCCAFFERY; NAUEN, 2006). De outra forma, segundo a OMS, é a capacidade de sobrevivência de um indivíduo a uma concentração de inseticida que naturalmente causaria a sua morte (BRAGA; VALLE, 2007a).

O uso continuado de inseticidas tem o potencial de selecionar os indivíduos resistentes numa população de vetores, eliminando os suscetíveis e reduzindo a variabilidade genética. Assim, a resistência a um determinado princípio ativo não é criada, mas são selecionados os indivíduos que naturalmente têm características genéticas favoráveis pré-adaptativas e que, sem uma pressão seletiva sobre esta característica, está em baixa proporção na natureza (MALLET, 1989; BRAGA; VALLE, 2007a; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Além disso, já foram relatados custos de aptidão/valor adaptativo relacionados à resistência, reduzindo a longevidade, sucesso reprodutivo, capacidade alimentar e mudanças de comportamento destes indivíduos

(RIVERO *et al.*, 2010; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Assim, uma vez cessada a pressão com inseticida, as populações retornam ao seu estado de suscetibilidade, caso a resistência não tenha sido estabelecida pela eliminação de todos os indivíduos suscetíveis (MALLET, 1989; BRAGA; VALLE, 2007a; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

A seleção dos insetos resistentes a inseticidas tem aumentado continuamente ao longo dos anos (MALLET, 1989; GEORGHIOU, 1994). Nas populações de *A. aegypti* a resistência ao malation já foi detectada em vários países do mundo como a Índia (SONI *et al.*, 2018), Paquistão (ARSLAN *et al.*, 2016) e Indonésia (HAMID *et al.*, 2017) na Ásia; a Jamaica (FRANCIS *et al.*, 2017) e México (LÓPEZ-SOLÍS *et al.*, 2020) na América do Norte; e, na América do Sul, a Guiana Francesa (GUIDEZ *et al.*, 2020), Peru (PINTO *et al.*, 2019) e Brasil (CAMPOS *et al.*, 2020).

2.7.1 Mecanismos de resistência a inseticidas

Os mecanismos de resistência são classificados tradicionalmente em metabólicos, causados por aumento de atividade de enzimas de biotransformação, e mecanismos moleculares, caracterizados por mutações pontuais em genes alvo de inseticidas que reduzem a sensibilidade do sítio-alvo (HEMINGWAY *et al.*, 2004; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Há, também, mecanismos de resistência comportamental e de alterações no exoesqueleto que causam redução da penetração de inseticida como resultado de alterações genéticas (HEMINGWAY *et al.*, 2004; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Todos estes mecanismos, associados ou de forma individual, podem causar altos níveis de resistência a diferentes classes de inseticidas (HEMINGWAY *et al.*, 2004).

A resistência comportamental ocorre quando o inseto reconhece a presença do inseticida e altera seu comportamento para evitar o contato com o produto. Este mecanismo é mais estudado em vetores de patógenos que causam a malária e envolvendo inseticidas piretróides e organoclorados, que podem atuar como irritantes e repelentes, propiciando a redução de entrada de mosquitos nas residências, menor tempo de permanência e redução do sucesso de alimentação com sangue (MALLET, 1989; MATHENGE *et al.*, 2001; HEMINGWAY *et al.*, 2004).

A cutícula é uma barreira importante para a proteção dos insetos em relação ao ambiente onde vivem (RIAZ *et al.*, 2013). Geralmente um xenobiótico é absorvido

rapidamente pelo integumento, atuando no seu sítio-alvo, entretanto a redução da penetração de inseticida é um mecanismo que pode afetar essa absorção através de alterações no exoesqueleto que reduzem a sua permeabilidade (GEORGHIOU, 1994). Embora a base bioquímica não esteja elucidada, a composição proteica do integumento bem como aumento de espessura e alterações da cutícula parecem ser importantes na redução da permeabilidade (HEMINGWAY *et al.*, 2004; BRAGA; VALLE, 2007a; RIAZ *et al.*, 2013). A redução da penetração de inseticida já foi considerado pouco importante na resistência (BRAGA; VALLE, 2007a), entretanto cada vez mais, os estudos de resistência metabólica têm encontrado aumento de expressão de proteínas cuticulares relacionados a populações de *A. aegypti* resistentes a inseticidas, evidenciando a importância deste mecanismo (RIAZ *et al.*, 2013; DAVID *et al.*, 2014), inclusive ao malation (LOREDO, 2017).

A resistência mediada por insensibilidade ao sítio ativo ocorre por modificações nas moléculas alvo dos inseticidas que tornam a ligação menos eficiente ao princípio ativo, tornando o organismo total ou parcialmente resistente a esta molécula (BRAGA; VALLE, 2007a; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Essas alterações são decorrentes de mutações pontuais no gene das moléculas envolvidas como na acetilcolinesterase na resistência aos organofosforados e carbamatos, nos canais de sódio regulados por voltagem para piretróides e organoclorados e nos receptores GABA para ciclodienos e organoclorados (HEMINGWAY *et al.*, 2004; BRAGA; VALLE, 2007a; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Este tipo de mecanismo é mais facilmente detectável uma vez que ocorrem em regiões específicas do gene, que codifica para o sítio-alvo de inseticidas, em enzimas altamente conservadas, com cópia única e cujas mutações não podem comprometer sua função no organismo (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

A resistência metabólica é caracterizada pelo aumento de atividade enzimática causada por um composto exógeno, envolvendo uma grande quantidade de enzimas que atuam em série desde a biotransformação à excreção destes compostos danosos. Este mecanismo é muito relevante na resistência, impedindo que o princípio ativo inseticida atinja seu sítio-alvo (BRAGA; VALLE, 2007a; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Este aumento de atividade pode ser causado por mutações pontuais no gene das enzimas envolvidas que aumentam a afinidade com o substrato ou a eficiência nas reações, bem como pelo aumento da expressão gênica dessas enzimas como resultado de amplificação gênica

ou regulação positiva através de alterações no promotor do gene (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

Uma grande gama de enzimas participa deste mecanismo e é comum que atuem em mais de uma classe de inseticidas causando a resistência cruzada. Devido ao intenso uso de vários inseticidas simultaneamente, os insetos podem ter também resistência causada por diversos mecanismos a diferentes inseticidas simultaneamente, chamada resistência múltipla (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Três classes de enzimas estudadas por atuarem na biotransformação de xenobióticos, incluindo inseticidas, são as citocromo oxidases P_{450} monooxigenases (P_{450}), esterases (ESTs) e glutathione-S-transferases (GSTs) (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007).

Diferentemente da resistência molecular, a detecção dos mecanismos da resistência metabólica é muito mais complexa e difícil de ser desvendada pois há a participação de uma grande quantidade de enzimas de diferentes famílias enzimáticas que interagem com uma variedade de moléculas e com diferentes graus de afinidade por diferentes compostos (HEMINGWAY *et al.*, 2004; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

2.8 ENZIMAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA

2.8.1 Monooxigenases

Monooxigenases dependentes de citocromo P_{450} , também chamadas apenas de monooxigenases, P_{450} , citocromo oxidase P_{450} e oxidases de função mista são uma superfamília de enzimas hidrofóbicas muito importantes por atuarem na regulação de compostos endógenos como hormônios, ácidos graxos e esteróides e na biotransformação de compostos exógenos como drogas, inseticidas e toxinas vegetais (SCOTT, 1999; HEMINGWAY *et al.*, 2004). As monooxigenases atuam realizando a oxidação de substratos com a participação de P_{450} redutase, NADPH, fosfolipídeos e citocromo P_{450} , uma proteína heme que atua como oxidase terminal nos sistemas das monooxigenases (SCOTT, 1999). Outra característica marcante desta superfamília de enzimas é a grande variabilidade de especificidade quanto aos seus substratos,

podendo uma enzima metabolizar uma grande variedade de substratos, como diferentes inseticidas e outras apenas um substrato (SCOTT, 1999).

A nomenclatura dos genes de citocromo oxidases P_{450} segue uma sequência específica que fornece informações sobre as enzimas. Cada gene codifica para apenas uma proteína e são identificáveis em itálico como *CYP* (**cytochrome** P_{450} - CYP) que representa a superfamília de enzimas (NELSON *et al.*, 1996). Um número em arábico representa a família a qual a enzima pertence (*CYP6*, *CYP9*) agrupados em sequências com mais de 40 % de similaridade, seguida de uma letra que representa a subfamília, com mais de 55 % de similaridade, se houver duas ou mais presentes na família (*CYP6N*) e, por último, um número arábico é a identificação numérica do gene (*CYP6N12*) (NELSON *et al.*, 1996). A nomenclatura para os produtos do gene como RNA mensageiro (mRNA), DNA complementar (cDNA) e proteína são realizados da mesma forma, entretanto não é utilizado o itálico (*CYP6N12*) (NELSON *et al.*, 1996).

As famílias de P_{450} encontradas em insetos são *CYP6*, 9, 12, 15, 18 e 28 específicas de insetos e *CYP4* também presentes em vertebrados (NELSON *et al.*, 1996; FEYEREISEN, 1999). A identificação dos genes responsáveis pelas alterações na resistência a inseticidas é complexa e difícil de realizar em todos os insetos, entretanto registros de aumento de atividade da enzima tem sido encontrados relacionados a famílias específicas de enzimas como *CYP6* e *CYP9* (HEMINGWAY *et al.*, 2004; NAQQASH *et al.*, 2016).

Monooxigenases são relacionadas principalmente à biotransformação de piretróides e à ativação de inseticidas organofosforados e, em menor proporção, a carbamatos, sendo considerada menos importante para o desenvolvimento de resistência a estas duas últimas classes (HEMINGWAY; RANSON, 2000; NAUEN, 2007). A maioria dos inseticidas organofosforados são pró-inseticidas e requerem a bioativação por monooxigenases, que realizam a transformação da forma fosforotionato à forma mais tóxica oxon, que interage com as esterases, incluindo a molécula alvo, a acetilcolinesterase (FEYEREISEN, 1999; SCOTT, 1999; HEMINGWAY *et al.*, 2004).

Monooxigenases têm papel importante no crescimento, desenvolvimento, alimentação, resistência a inseticidas e tolerância a toxinas vegetais (SCOTT, 1999). Estas enzimas atuam na resistência a inseticidas através de mecanismos de superexpressão e regulação positiva do gene associado à resistência através da sua

interação com produtos de genes reguladores (SCOTT; LIU; WEN, 1998; LIU *et al.*, 2015). A regulação positiva pode ocorrer através do mecanismo de indução, no qual a presença de xenobióticos promove o aumento da expressão gênica através da ativação de genes reguladores, e que pode auxiliar na adaptação dos insetos ao ambiente e na resistência a inseticidas (LIU *et al.*, 2015). Além disso, também ocorre a expressão simultânea de múltiplos genes de resistência desta família de enzimas que interagem, tornando os indivíduos resistentes (LIU *et al.*, 2015).

Outro mecanismo de resistência possível, é o aumento da taxa de metabolização de inseticida por alterações no sítio ativo que aumentem a atividade catalítica da enzima (SCOTT; LIU; WEN, 1998). De outra forma, como as monooxigenases atuam na bioativação de organofosforados, a resistência pode ocorrer para esta classe através da redução na taxa de ativação (KONNO; HODGSON; DAUTERMAN, 1989; SCOTT, 1999). Entretanto este mecanismo é raro, sendo o aumento da metabolização pelas esterases mais comum na resistência a esta classe de inseticidas (SCOTT, 1999).

2.8.2 Esterases

As esterases ou carboxilesterases, que apresentam o grupamento éster e éster carboxílico respectivamente, pertencem à classe das Hidrolases e catalisam a hidrólise de compostos endógenos e exógenos adicionando água para produzir álcool e ácido (WHEELOCK; SHAN; OTTEA, 2005). A maioria das classes inseticidas apresentam um grupamento éster e são metabolizados por esta família de enzimas, sendo associadas principalmente à biotransformação de inseticidas organofosforados e carbamatos e, em menor proporção, aos piretróides (HEMINGWAY; RANSON, 2000; BRAGA; VALLE, 2007a).

Há várias classificações para esta classe de enzimas, podendo ser α ou β esterases (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). Segundo a classificação de ALDRIDGE (1953) as esterases que são inibidas por organofosforados são β esterases, chamadas carboxilesterases, e as não inibidas, α esterases (ALDRIDGE, 1993; WALKER, 1993; HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). As β esterases, então, são fosforiladas pelos organofosforados e a reativação da enzima ocorre lentamente, enquanto as α esterases os hidrolizam imediatamente e continuamente (WALKER, 1993). Classificações alternativas, utilizadas para mosquitos *Culex*, são a afinidade

pelos substratos α e β naftil acetato, que são hidrolizados preferencialmente por α e β esterases respectivamente, e mobilidade eletroforética (GEORGHIOU; PASTEUR; HAWLEY, 1980; HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998).

Organofosforados e carbamatos têm alta afinidade por carboxilesterases, inibindo-as através da esterificação do resíduo de serina no sítio ativo, entretanto são substratos pobres para a enzima levando a uma lenta hidrólise (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). Desta forma, as carboxilesterases atuam predominantemente através do sequestro das moléculas inseticidas antes de atingirem o local alvo, a acetilcolinesterase, protegendo-a (KARUNARATNE *et al.*, 1993; HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998).

As α e β esterases interagem predominantemente com a forma ativa dos organofosforados, oxon, tendo pouca afinidade com a molécula original na sua forma inativa e não a reconhecendo (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). Os organofosforados são considerados substratos suicidas para as carboxilesterases pois inibem fortemente a enzima através da fosforilação do sítio ativo, tornando a ligação com substrato estável e impedindo a atividade catalítica da enzima (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; WHEELLOCK; SHAN; OTTEA, 2005). Embora as carboxilesterases realizem a hidrólise destes compostos, este processo ocorre de forma muito lenta, como por exemplo, um tempo de 32 horas para uma enzima metabolizar uma molécula de paraoxon em *Culex quinquefasciatus* (KARUNARATNE *et al.*, 1993; HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; WHEELLOCK; SHAN; OTTEA, 2005). Desta forma, a atuação dos organofosforados causa o envelhecimento das enzimas, tornando o seu principal mecanismo de atuação o sequestro das moléculas inseticidas (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; WHEELLOCK; SHAN; OTTEA, 2005). O mesmo processo ocorre com os inseticidas carbamatos, que metilcarbonilam as esterases, entretanto esta ligação é menos estável, sendo uma das razões pela qual esta classe de inseticida é considerada menos tóxica (WHEELLOCK; SHAN; OTTEA, 2005).

Os mecanismos de resistência envolvendo esterases foram mais estudados em mosquitos *Culex* e têm sido desvendados também para *Aedes* e *Anopheles* (HEMINGWAY; RANSON, 2000). O mecanismo mais comum em mosquitos é o quantitativo decorrente de amplificação gênica, que causa aumento da quantidade de enzimas disponíveis que sequestram as moléculas inseticidas antes que encontrem seu local alvo, ligando-se rapidamente, mas com metabolização lenta

(KARUNARATNE *et al.*, 1995; HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; HEMINGWAY; RANSON, 2000; GRIGORAKI *et al.*, 2016).

O mecanismo qualitativo, com aumento da velocidade de metabolização de inseticida sem aumento de enzimas, é menos comum, mas também já foi registrado para *Culex* e *Anopheles* envolvendo especificamente uma carboxilesterase associada ao inseticida malation (HEMINGWAY, 1985; ZIEGLER *et al.*, 1987; HEMINGWAY *et al.*, 2004). O aumento da atividade enzimática é decorrente de mutações pontuais nos genes de esterases que alteram as propriedades enzimáticas, como, por exemplo, as mutações G151D e W271L de *Culex* e *Anopheles* que participam na resistência a organofosforados (HEMINGWAY, 1985; CUI *et al.*, 2015).

Mecanismos quantitativos, decorrentes da superexpressão de carboxilesterases, causam alta resistência a inseticidas, sendo mais eficientes na resposta adaptativa do que mecanismos qualitativos, decorrentes de mutações, provavelmente devido ao menor custo de valor adaptativo (CUI *et al.*, 2015).

2.8.3 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase é uma serina esterase, uma enzima do sistema nervoso responsável por decompor o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético nas sinapses nervosas e junções musculares através da sua hidrólise, cessando o impulso nervoso e permitindo que o neurônio colinérgico retorne ao estado de repouso (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; HEMINGWAY *et al.*, 2004; COLOVIC *et al.*, 2013). Elas são as moléculas alvo de duas classes de inseticidas, os carbamatos e organofosforados que atuam na carbamilação e fosforilação permanente, respectivamente, do resíduo de serina do sítio ativo (BAILLIE, 1985; HEMINGWAY *et al.*, 2004). A enzima é inibida por competição do sítio ativo e a acetilcolina não pode ligar-se, acumulando-se nas junções nervosas, não permitindo que o estímulo nervoso seja interrompido, causando contrações rápidas dos músculos voluntários com paralisia e posterior morte do inseto (WARE; WHITACRE, 2004; BRAGA; VALLE, 2007a).

A acetilcolinesterase atua na resistência a inseticidas através de mecanismos moleculares e metabólicos (LABBÉ *et al.*, 2007; DJOGBÉNOU *et al.*, 2008; EDI *et al.*, 2014). Na família Culicidae, dois genes são responsáveis por codificar esta enzima, *ace-1* e *ace-2*, enquanto em dípteros das famílias Drosophilidae e Muscidae ocorreu

a perda secundária do gene *ace-1* e há apenas um gene responsável por sua codificação, o *ace-2* (WEILL *et al.*, 2002). Em Culicidae, o gene responsável pelo desenvolvimento de resistência, uma vez que codifica para o sítio alvo dos organofosforados, é o *ace-1*, enquanto nas outras duas famílias é o gene *ace-2* (WEILL *et al.*, 2002). Em mosquitos *A. aegypti* são raros os mecanismos moleculares e metabólicos envolvendo a acetilcolinesterase, que afetem a resistência a organofosforados, entretanto, estudos de atividade enzimática e insensibilidade do sítio ativo aos inseticidas são comumente realizados (VIANA-MEDEIROS; BELLINATO; VALLE, 2018; VALLE *et al.*, 2019).

A resistência molecular é causada por mutações pontuais no sítio ativo da acetilcolinesterase que levam à insensibilidade da enzima ao inseticida, levando a um fenótipo resistente (WEILL *et al.*, 2003). Já foram encontradas mutações pontuais no gene *ace-1* que afetam a sensibilidade da enzima em mosquitos *Culex* e *Anopheles*, sendo a mais importante a mutação G119S (nomenclatura de *Torpedo californica*, Toutant, 1989), substituição de glicina por serina na posição 119, que causa elevada resistência a organofosforados e carbamatos (WEILL *et al.*, 2003, 2004a). Esta mutação altera o sítio ativo e a serina reduz o acesso às tríades catalíticas, impedindo que o princípio ativo inseticida atinja seu local alvo, mas também afetando a ligação da acetilcolina e, com isso, havendo um aumento do custo de valor adaptativo (WEILL *et al.*, 2004a). Além da G119S, são relacionadas à insensibilidade do sítio ativo também as mutações pontuais F290V no gene *ace-1* e F455W no gene *ace-2* (NABESHIMA *et al.*, 2004; ALOUT *et al.*, 2007).

Em contraste a isto, em mosquitos *Aedes*, mutações no gene *ace-1* que afetem consideravelmente a resistência a organofosforados ainda não foram encontradas até o momento (BISSET; RODRÍGUEZ; FERNÁNDEZ, 2006; MORI *et al.*, 2007; DOS SANTOS *et al.*, 2020). Foi registrada apenas uma mutação silenciosa em *A. aegypti*, T506T, que, em associação com os bioensaios, demonstrou um padrão genotípico relacionado ao nível de resistência (HASMIWATI; RUSJDI; NOFITA, 2018). Embora também já tenha sido encontrada uma mutação sinônima de G119S que alterou em 15 % a sensibilidade da acetilcolinesterase (MUTHUSAMY; SHIVAKUMAR, 2015), é uma mutação pouco provável de acontecer em *A. aegypti* uma vez que a glicina é codificada por um códon diferente das espécies analisadas de *Culex* e *Anopheles* e necessita de dois eventos consecutivos de mutação para que passe a codificar uma serina, causando a insensibilidade do sítio ativo (WEILL *et al.*,

2004b). Da mesma forma, a mutação F455W necessita de dois eventos consecutivos de substituição de base, entretanto a F290V é mais provável e depende de apenas um evento (MORI *et al.*, 2007).

Em espécies de mosquitos *Culex* e *Anopheles* já foram encontradas duplicações no gene *ace-1* levando a uma maior expressão gênica desta enzima e resultando no desenvolvimento de elevada resistência (LABBÉ *et al.*, 2007; DJOGBÉNOU *et al.*, 2008; EDI *et al.*, 2014). Um dos genes encontrados apresenta a mutação G119S que causa insensibilidade do sítio ativo e resistência a inseticidas, enquanto o outro gene foi encontrado duplicado, mas sem a mutação, levando à diminuição do custo de valor adaptativo causado pela acumulação da acetilcolina na sinapse devido à mutação (LABBÉ *et al.*, 2007; DJOGBÉNOU *et al.*, 2008; EDI *et al.*, 2014).

Em mosquitos *Aedes*, já foi sugerido que um aumento de atividade enzimática estaria relacionado a duplicação gênica ou aumento de expressão gênica em uma população de *A. aegypti* brasileira (VIANA-MEDEIROS *et al.*, 2017). Entretanto, até o momento, não foram encontradas evidências da atuação deste mecanismo e ainda não há estudos sobre a expressão gênica desta enzima, nem estudos moleculares que evidenciem duplicação gênica.

2.9 DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

2.9.1 Bioensaios de suscetibilidade

Nas campanhas de erradicação da malária, após 1945, o uso do inseticida DDT permitiu a erradicação da malária em regiões temperadas. Entretanto, após tantos anos de uso intensivo, o sucesso dessas campanhas reduziu, sendo uma das razões a seleção de resistência aos inseticidas nos vetores. Então, a partir de 1960, a OMS passou a acompanhar a resistência aos vetores, em nível mundial, fornecendo kits para detecção de resistência, que já havia sido detectada para os organoclorados, organofosforados, carbamatos e outros compostos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1976).

Para a detecção de resistência a OMS recomendou na década de 1960 a utilização de uma técnica padrão de monitoramento em mosquitos adultos de forma a

melhorar a detecção e mensuração da resistência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1960) e em 1976 este teste passou a ser utilizado como padrão para detectar suscetibilidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1976). O bioensaio de suscetibilidade distingue mosquitos resistentes de suscetíveis e consiste de um teste de mortalidade em que mosquitos são expostos a uma concentração conhecida de inseticida por um tempo fixo e avaliados posteriormente. Este teste é utilizado como ferramenta de vigilância da resistência, entretanto fornece poucas informações sobre os mecanismos que promovem a resistência ou a sua intensidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1960, 2016; VALLE *et al.*, 2019).

Uma vez estabelecido, o método de bioensaio com papel impregnado permaneceu praticamente inalterado desde seu desenvolvimento e padronização até hoje (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1960, 2016), sendo feitas apenas atualizações, principalmente dos inseticidas utilizados nos testes de suscetibilidade a cada nova publicação dos procedimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1976, 1998, 2013, 2016). Tendo em vista a necessidade de monitoramento intensivo da resistência a inseticidas e de documentos que pudessem auxiliar no desenvolvimento de estratégias nacionais, as diretrizes foram atualizadas recentemente, em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Inicialmente, a menor concentração que ocasionava 100 % de mortalidade de mosquitos suscetíveis era utilizada como uma linha de base para detecção de resistência, sendo usada para realizar os testes de rotina com populações de campo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1960, 1976). A partir da padronização do método, em 1976, as concentrações foram fornecidas nas diretrizes para alguns inseticidas e atualizadas a cada nova edição. Inicialmente, foram padronizadas concentrações de carbamatos, organofosforados, organoclorados e, em 1998, para os piretróides que começavam a ser utilizados com maior intensidade no controle de vetores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1976, 1998, 2013).

O teste de suscetibilidade da OMS utilizando papel impregnado consiste na exposição de fêmeas adultas de campo a uma concentração conhecida de inseticida por um tempo fixo, projetados para matar uma população suscetível de laboratório. Os indivíduos sobreviventes a esta concentração podem ser considerados resistentes. Esta quantidade de inseticida é chamada de concentração discriminante (CD) e consiste no dobro da quantidade de inseticida mínima necessária para matar 100 % das fêmeas de uma população suscetível (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A porcentagem de mortalidade é utilizada para fornecer a resposta de resistência da população testada. Se a mortalidade for maior que 98 % a população é considerada suscetível ao inseticida testado. Se a mortalidade estiver entre 90 % e 97 % é indício de que existe resistência e deve ser confirmada com nova exposição ao inseticida ou ferramentas bioquímicas e moleculares. Se a mortalidade obtida for menor que 90 % ou a repetição causar uma mortalidade menor que 98 %, então a resistência é confirmada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Uma vez detectada a resistência, para alguns inseticidas deve-se fazer bioensaios com cinco e dez vezes a concentração discriminante para obtenção do nível de resistência, entretanto, não há esta especificação para o malation (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Concentrações discriminantes tanto para adultos como larvas de diversas espécies de vetores de patógenos foram estabelecidas e testadas para vários inseticidas pela OMS em 1992. A concentração recomendada para os testes de suscetibilidade em mosquitos adultos de *A. aegypti* para o malation foi de 0,8 % (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). Entretanto estes dados não foram disponibilizados nas edições posteriores dos manuais de resistência em vetores, uma vez que foram direcionados ao controle da malária, cujo plasmódio é transmitido por mosquitos do gênero *Anopheles*, cuja CD de 5 % foi mais acessível nos manuais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998, 2013). Apenas no último manual de procedimentos a informação sobre a CD para mosquitos *Aedes* foi recuperada, dado que muitos países necessitam realizar o monitoramento da resistência também para outros vetores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Nos bioensaios de suscetibilidade, as características biológicas dos indivíduos também são importantes uma vez que a idade, o estado fisiológico e o gênero dos mosquitos podem influenciar nos resultados de sensibilidade aos inseticidas. Desta forma, o uso de indivíduos provenientes de coleções larvais ou insetários estabelecidos permite controlar estas fontes de variação, garantindo maior comparabilidade entre os resultados. Como por exemplo: a idade das fêmeas pode ser mantida constante para os bioensaios, pode-se selecionar a quantidade necessária de fêmeas dos indivíduos totais, a variação ambiental e alimentar entre as amostras é baixa ou ausente e há pouca variação das condições fisiológicas dos indivíduos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Um método alternativo ao bioensaio de suscetibilidade da OMS foi desenvolvido por Brogdon e McAllister em 1998, o teste de garrafa do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Este teste avalia a mortalidade sob uma dose e tempo discriminante, sendo detectada a resistência com base num tempo discriminante necessário para matar mosquitos suscetíveis (BROGDON; MCALLISTER, 1998; AÏZOUN *et al.*, 2013; BROGDON; CHAN, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Ambos os ensaios são utilizados atualmente para monitoramento da resistência, entretanto diferem na forma como o inseticida é entregue e como é medida a suscetibilidade. Enquanto o teste de suscetibilidade da OMS avalia a mortalidade sob uma concentração discriminante, o teste de garrafa do CDC avalia quantidade de mosquitos incapacitados num tempo discriminante e, portanto, os resultados obtidos não são diretamente comparáveis (BROGDON; CHAN, 2013; OWUSU *et al.*, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016)

Com o avanço de populações resistentes, o conhecimento sobre a resistência aos inseticidas é importante para o monitoramento e planejamento de controle eficaz de vetores e no manejo do inseticida utilizado. Desta forma é importante o aumento de testes de suscetibilidade nos programas de monitoramento para que a resistência seja detectada em populações de mosquitos precocemente no sentido de garantir a manutenção dos compostos químicos como auxiliares ao controle dos vetores (VALLE *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2020).

2.9.2 Ferramentas moleculares para detecção de resistência

Aliado aos bioensaios de suscetibilidade, a OMS recomenda que sejam realizados testes suplementares genéticos e bioquímicos para determinar os mecanismos de resistência envolvidos e detectar o avanço de populações resistentes. Todas estas ferramentas podem auxiliar no controle de vetores e impedir a propagação de resistência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013, 2016; VALLE *et al.*, 2019).

A resistência ocasionada por mutações de sítio alvo, na molécula alvo do inseticida é mais fácil de ser realizada uma vez que estas moléculas são específicas a determinados inseticidas e sua função evolutiva é altamente conservada (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; DONNELLY; ISAACS; WEETMAN, 2016). Essas moléculas

geralmente são codificadas por genes de cópia única que não suportam muitas modificações, uma vez que podem comprometer sua função biológica (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Logo, estas alterações podem ser detectadas através de sequenciamento genético do local alvo do inseticida, seguido pela comparação de polimorfismos genéticos entre populações de mosquitos resistentes e suscetíveis para detectar alterações genéticas que possam estar relacionadas à resistência (FAUCON *et al.*, 2015; DONNELLY; ISAACS; WEETMAN, 2016). Exemplos do uso deste tipo são as detecções de mutações nos genes *kdr* para resistência a piretróides e DDT e *ace-1* para resistência a organofosforados e carbamatos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A detecção de resistência metabólica associada a um inseticida específico é, entretanto, muito mais difícil de ser realizada. As famílias de enzimas envolvidas na resistência metabólica podem ter centenas de diferentes espécies moleculares com diferentes graus de afinidade por diferentes compostos e, podem, inclusive ser redundantes para diferentes compostos ou terem maior ou menor especificidade por um mesmo substrato (STRODE *et al.*, 2008; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Assim, para detectar a participação de algum destes mecanismos em resposta à resistência a um determinado inseticida, há diversos tipos de ferramentas que mostram diferentes resultados e interpretações como ensaios bioquímicos e estudos de expressão gênica (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

Os ensaios bioquímicos são utilizados para detectar a participação de famílias enzimáticas utilizando substratos genéricos e pouco específicos. A atividade enzimática é avaliada através da absorbância emitida utilizando corantes e comprimentos de onda específicos em resposta à atuação de enzimas que degradam os substratos fornecidos (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; BHARATI; SAHA, 2017). Também são realizados ensaios de insensibilidade da enzima acetilcolinesterase através da exposição a um inibidor, como o carbamato propoxur, para observar se há alteração da sensibilidade do sítio ativo destas enzimas (LEONG *et al.*, 2019).

Os estudos de expressão gênica, por outro lado, são compostos por diversos métodos. Como, por exemplo, microarranjos de DNA como o *Aedes Detox Chip*, compostos por sondas que reconhecem diversos genes das famílias envolvidas na biotransformação de xenobióticos e detectam pequenas alterações na sua expressão (STRODE *et al.*, 2008; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). De forma semelhante à detecção de mutações pontuais na resistência molecular, podem ser realizados

sequenciamentos de genes de enzimas de biotransformação a fim detectar mutações, amplificação gênica e polimorfismos que possam ser utilizados como marcadores de resistência (FAUCON *et al.*, 2015). Outra forma de avaliação da expressão gênica é através da avaliação individual da expressão de mRNAs de genes relacionados à resistência em populações resistentes e suscetíveis comparando seus níveis de expressão através de reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) ou de sequenciamento de RNAs (REID *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2015; FAUCON *et al.*, 2017).

2.10 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CIDADE DE PARANAGUÁ

A cidade de Paranaguá tornou-se epidêmica para a dengue recentemente, a partir de 2015/2016, quando ocorreu a primeira epidemia de dengue no município (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2016a). Os boletins informativos da Secretaria da Saúde do Estado do Paraná (SESA) registraram, nos anos anteriores, apenas casos alóctones, de pessoas que contraíram a dengue de outros municípios ou estados, desde 2005 até 2014, quando houve o registro do primeiro caso autóctone para dengue (TABELA 2) (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2021a). No primeiro semestre do ano de 2015 foram registrados mais sete casos autóctones e, no verão do próximo ano, 2016, foram confirmados 15.538 casos na cidade caracterizando a primeira epidemia de dengue na cidade com 29 mortes. Depois disto, anualmente ocorreram casos autóctones de dengue na cidade, com exceção do período 2017/2018, e não houve outros eventos epidêmicos nos anos seguintes (TABELA 2) (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2021a).

Em relação às arboviroses Zika e chikungunya, transmitidas pelo mosquito *A. aegypti*, os registros começaram durante a epidemia de dengue em 2015/2016 e foram registrados nove e dez casos autóctones de chikungunya em 2016 e 2017, respectivamente, e um caso de Zika em 2017 (TABELA 2) (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2021a).

TABELA 2. CASOS DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA REGISTRADOS NA CIDADE DE PARANAGUÁ E INFESTAÇÃO PELO MOSQUITO *Aedes aegypti* ENTRE OS ANOS DE 2008 E 2021

Anos	Dengue		Zika		Chikungunya		Presença de <i>A. aegypti</i>	
	ALO	AUT	ALO	AUT	ALO	AUT	IIP (%)	Infestação
2008	0	0	-	-	-	-	-	Não infestado
2009	0	0	-	-	-	-	0,0	Não infestado
2010	6	0	-	-	-	-	-	Não infestado
2011/2012	4	0	-	-	-	-	0,0	Não infestado
2012/2013	6	0	-	-	-	-	0,0	Não infestado
2013/2014	1	1	-	-	-	-	0,0	Não infestado
2014/2015	36	7	-	-	-	-	0,0	Não infestado
2015/2016	241	15.538	5	0	0	9	1,2 **	Infestado
2016/2017	0	35	0	1	0	10	-	-
2017/2018	0	0	0	0	0	0	-	Infestado
2018/2019	4	30	0	0	0	0	2,1/ 3,7/ 4,8*	Infestado
2019/2020	2	1681	0	0	0	0	1,0/ 4,0/ 2,7*	Infestado
2020/2021	0	2229	0	0	0	0	5,9 **	Infestado

FONTE: (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2021a)

Legenda: ALO: alóctone; AUT: autóctone; IIP: Índice de Infestação Predial

* Primeiro, segundo e terceiro ciclo de levantamentos informados, respectivamente

** Ciclo único de levantamentos informado

Nos boletins epidemiológicos de 2013/2014 e 2014/2015, que antecederam a epidemia em Paranaguá, a SESA informou aos municípios que o Serviço de Alerta Climático de Dengue do Laboratório de Climatologia da UFPR considerou a situação climática como de alto risco à proliferação do mosquito *A. aegypti* e recomendou que as cidades realizassem as medidas de controle necessárias como a eliminação de potenciais criadouros, incluindo os municípios do litoral, que não se mostravam infestados (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2014, 2015a).

Entretanto, apesar dos registros apresentados nos boletins informarem que no período que antecedeu a epidemia em Paranaguá não houvesse infestação pelo mosquito *A. aegypti*, entrevistas realizadas posteriormente ao Ministério Público do Paraná pela Gazeta do Povo, evidenciaram que o município estava em condições propícias ao desenvolvimento do vetor e à ocorrência de epidemias (LAURA BEAL BORDIN, 2016). Segundo o Ministério Público, os gestores do município de Paranaguá vinham sendo avisados desde 2013 sobre a possibilidade de ocorrência de uma epidemia, entretanto ações recomendadas não foram realizadas. Dentre elas estava a pouca disponibilidade de agentes de endemia para a vigilância entomológica e as condições de risco do município como ser área portuária, problemas de

saneamento básico como lixo e esgoto, ocupações irregulares e degradação ambiental (LAURA BEAL BORDIN, 2016).

Já no primeiro informe técnico de 2015/2016, o litoral estava em risco climático médio para o desenvolvimento de *A. aegypti*, embora os informativos ainda considerassem o litoral sem infestação pelo vetor (TABELA 2) (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2015b). No terceiro informe deste ciclo, em dezembro de 2015, a cidade de Paranaguá foi a que mais apresentou casos de dengue e, pela primeira vez, foi considerada infestada pelo mosquito *A. aegypti* (TABELA 2) (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2015c). Em janeiro de 2016, foi registrada a primeira epidemia de dengue na cidade (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2016a). Apesar da ausência de epidemias em Paranaguá nos últimos anos, a cidade ainda apresenta infestação pelo mosquito *A. aegypti* e condições propícias ao desenvolvimento do vetor e à ocorrência de novas epidemias (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2021b).

Foram registrados nos boletins, também, algumas atividades de controle vetorial, em resposta às epidemias que ocorriam no Paraná e, em especial, em Paranaguá nos anos de 2015 e 2016. Em dezembro de 2015, a prefeitura e o Governo do Estado realizaram ações para o controle do vetor compostas por atividades de bloqueio com inseticida “*fumacê*” para atingir a forma alada do mosquito, quando foi enviada uma frota de camionetes para lançar inseticida e o Governo do Estado ainda direcionou suporte financeiro para ações preventivas (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2016a). Outro ciclo de aplicações de inseticida “*fumacê*” ainda aparece nos boletins, sendo sete aplicações de abril a junho de 2016 (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2016b, 2016c). O inseticida fornecido aos municípios do Paraná, neste período, para a realização da aplicação a UBV foi o malation (G1 PR, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020).

Nos anos seguintes, outras aplicações de inseticida foram registradas através de meios de comunicação local. Houve menção de aplicações de malation em maio de 2017, entretanto não há informações sobre a quantidade de inseticida disponibilizada (FOLHA DO LITORAL, 2017). Devido ao aumento da densidade vetorial, de 11 de dezembro de 2017 seguindo-se 25 dias, em janeiro de 2018, foram realizados cinco ciclos de aplicação de inseticida com duração de três a cinco dias

(FOLHA DO LITORAL, 2017). Nova aplicação de inseticidas em cinco ciclos foi registrada em seguida, de 16 de janeiro a 09 de fevereiro de 2018 (FOLHA DO LITORAL, 2018).

Apesar disto, informações sobre a aplicação de inseticidas na cidade de Paranaguá não é precisa e não está disponível com facilidade. Entretanto a ocorrência abrupta de uma epidemia na cidade levou à utilização de uma grande quantidade de produtos inseticidas, informados sem detalhamento nos boletins da dengue da SESA/PR, para mitigar a situação em que a cidade se encontrava, na tentativa de tentar reduzir a densidade populacional do vetor e com isso reduzir a transmissão das arboviroses (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2021a). Outros ciclos foram registrados posteriormente, antecedendo a realização deste trabalho, e este foi um cenário propício à seleção de indivíduos resistentes nas populações de mosquitos ao inseticida utilizado.

3 JUSTIFICATIVA

Milhões de pessoas estão em áreas de risco à transmissão de arboviroses transmitidas por *A. aegypti* no mundo, onde ocorre a sua presença ou, inclusive, infestação pelo vetor. Não há vacinas eficientes disponíveis nem tratamentos específicos para estas arboviroses, sendo necessário o monitoramento e posterior controle do vetor, se necessário, para impedir a transmissão dessas doenças. *Aedes aegypti* é uma espécie antropofílica que se desenvolve, sobretudo, em áreas urbanas onde há abundância de criadouros naturais e artificiais, além de condições precárias de saneamento e fornecimento de água, bem como destinação inadequada de resíduos sólidos. Embora o controle do vetor comece na resolução de problemas estruturais e educação comunitária, em uma abordagem preventiva, na prática há um alto custo envolvido quando comparado ao controle químico do vetor, sendo este utilizado nas ações de controle vetorial, apesar de sua limitação temporal e espacial.

O controle químico do vetor leva a passivos indesejados, como a contaminação ambiental com as moléculas utilizadas, bem como prejuízos à saúde humana e animal, além de ter pouca seletividade aos organismos alvo e causar pressão de seleção nos vetores aos princípios ativos dos inseticidas utilizados. Dada a velocidade e abrangência com que as populações do vetor desenvolvem resistência a diferentes princípios ativos como resultado da importância dada ao controle químico em detrimento de ações preventivas, vem ocorrendo o esgotamento das opções de princípios ativos que podem ser utilizados em saúde pública.

Para tanto, o monitoramento utilizando bioensaios de suscetibilidade, bem como a descoberta de mecanismos moleculares envolvidos na resistência a diferentes inseticidas, podem auxiliar no mapeamento da resistência e permitem que ações de controle sejam direcionadas. A detecção de populações resistentes permite que o manejo adequado de inseticidas possa ser realizado para a manutenção do recurso químico como um auxiliar ao controle de vetores.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estado da resistência ao malation em uma população de *A. aegypti* de Paranaguá, considerando resultados de bioensaios de exposição e a expressão de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer a concentração discriminante do malation nas condições locais utilizando um insetário referência de *A. aegypti*.

Determinar o estado da resistência ao malation, em uma população de *A. aegypti* proveniente da cidade de Paranaguá (PR).

Avaliar o nível de expressão gênica das enzimas acetilcolinesterase, esterase β e citocromo oxidase P₄₅₀, associadas ao metabolismo do malation em *A. aegypti*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DOSE-RESPOSTA E CONCENTRAÇÃO DISCRIMINANTE

5.1.1 Insetário referência de *Aedes aegypti*

Mosquitos sensíveis a inseticidas utilizados como referência para a espécie *A. aegypti* em todos os experimentos pertencem à linhagem *Rockefeller* (KUNO, 2010). Indivíduos para este insetário foram obtidos do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Laficave) da Fiocruz e está sendo mantida no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (Lamfic²) do Departamento de Zoologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (Paraná, Brasil).

Os adultos e imaturos de *A. aegypti* são mantidos em insetário sob condições de biossegurança, com estrutura adequada que impede o acesso ou saída dos insetos. A sala é mantida em temperatura controlada em $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e luminosidade natural.

5.1.2 Curva dose-resposta e concentração discriminante

A curva de calibração para delimitação da concentração discriminante foi realizada, uma vez que a avaliação da dose de 0,8 % de malation recomendada pela OMS para a realização de bioensaios de resistência em *Aedes* spp. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016) não causou a mortalidade esperada nas fêmeas avaliadas.

Para isto, foram testadas 938 fêmeas do insetário referência de *Rockefeller*. A curva dose-resposta foi realizada através da avaliação da mortalidade das fêmeas em cinco concentrações de inseticida: $20\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ (0,8 %), $25\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ (1,1 %), $32,5\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ (1,3 %), $35\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ (1,4 %) e $35,5\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ (1,42 %).

A porcentagem de mortalidade em cada concentração foi obtida considerando o número de fêmeas vivas e mortas em cada bioensaio, através da razão entre fêmeas mortas pelo total de fêmeas testadas para cada concentração, multiplicado por 100 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A regressão *Probit*, bem como seu

tratamento estatístico, foi utilizada para estimar a concentração que ocasionaria 99,9 % de mortalidade, a CL₉₉. O pacote “ecotoxicologia” (GAMA, 2015) foi utilizado no programa R (v.3.0.1) (R CORE TEAM, 2018) para obter as concentrações letais.

A concentração discriminante é definida como o dobro da concentração de inseticida que proporciona 99,9 % da mortalidade (CL 99,9) numa população suscetível (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Desta forma, ela foi calculada, multiplicando por dois a concentração de inseticida que causou a morte de 99 % das fêmeas do insetário de *Rockefeller*. Esta quantidade de inseticida foi utilizada posteriormente para os bioensaios com a população de campo.

5.1.3 Impregnação dos papéis

Os testes de sensibilidade ao inseticida foram realizados utilizando o método de papéis da OMS, impregnados manualmente de acordo com suas instruções (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Para a impregnação foi utilizado o inseticida malation (Pestanal® 98 % Sigma-Aldrich), sendo aplicado em papel filtro qualitativo Whatman® grau 1, de dimensões 12 cm x 12 cm que se encaixam nos tubos de bioensaio (FIGURA 2). Azeite de oliva extravirgem orgânico comum foi utilizado como carreador e diluente para o inseticida nas concentrações desejadas, levando-se em conta a correção de densidade (TABELA 3). O azeite e o inseticida foram pesados em balança de precisão no peso equivalente à 700 mL, ao qual foi acrescentado a mesma proporção de acetona para dissolver a solução e facilitar sua distribuição no papel. Os papéis do grupo controle foram impregnados apenas com azeite de oliva e acetona na mesma proporção.

A impregnação em toda a área do papel foi realizada utilizando uma pipeta multicanal, evitando sobrepor as gotas de forma a não alterar a concentração de inseticida. Os papéis já impregnados foram deixados por 24 horas em capela de exaustão para evaporação completa da acetona. Posteriormente, foram armazenados individualmente em papel alumínio e mantidos a 4°C até o momento da utilização.

TABELA 3. QUANTIDADE APROXIMADA DE REAGENTES UTILIZADOS PARA IMPREGNAÇÃO DOS PAPÉIS REFERENTES A CADA CONCENTRAÇÃO DE INSETICIDA, PARA TODOS OS BIOENSAIOS REALIZADOS

Concentração		Inseticida	Azeite	Azeite + Inseticida		Acetona
$\mu\text{g cm}^{-2}$	%	mg	mg	mg	mL	mL
Controle	0,00	0,00	630,00	630,00	700,00	700,00
20,00	0,80	5,60	625,00	630,60	700,67	700,00
25,00	1,10	7,70	623,00	630,70	700,78	700,00
32,50	1,30	9,10	621,00	630,10	700,11	700,00
35,00	1,40	9,80	621,00	630,80	700,89	700,00
35,50	1,42	9,92	621,00	630,92	701,02	700,00
85,25	3,41	23,90	607,00	630,90	701,00	700,00
125,00	5,00	35,00	595,00	630,00	700,00	700,00

5.1.4 Bioensaios com papel impregnado

Os bioensaios foram realizados utilizando o kit da OMS para papéis impregnados, que compreende tubos de 12 cm \times 4 cm, um de exposição ao inseticida e outro de descanso (FIGURA 2), seguindo as orientações da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Grupos de 20 a 25 fêmeas entre um e três dias de vida, não alimentadas com sangue, foram inseridas diretamente nos tubos contendo o papel impregnado com o inseticida. Os tubos foram mantidos em posição horizontal durante uma hora, período de exposição, e ao abrigo da luz e, em seguida, as fêmeas foram transferidas para o tubo de descanso contendo um quadrado de papel filtro limpo. A transferência foi realizada com a inversão dos tubos, de forma que o tubo de descanso ficasse à cima e as fêmeas fossem em direção à luz e para o tubo superior, bem como com o auxílio de sopro para direcioná-las. As fêmeas foram mantidas sob fotoperíodo 12:12 e alimentadas com mel 10 %. Todas as exposições no kit da OMS foram realizadas entre os horários de 8 e 18 horas. A mortalidade foi contabilizada após 24 horas da exposição. Fêmeas foram consideradas vivas se estivessem ágeis e aptas a voar, independentemente do número de pernas restantes e foram consideradas mortas se estivessem imóveis ou incapazes de levantar ou voar, independentemente de terem pernas e asas intactas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

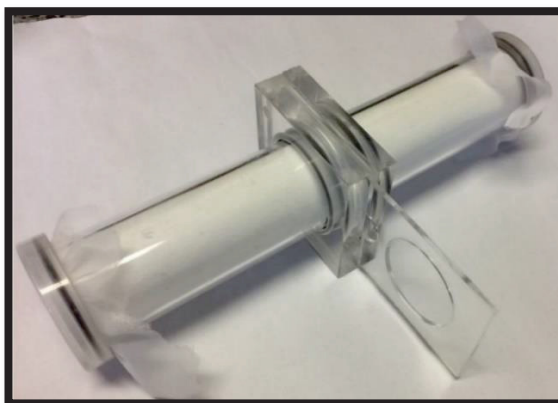


FIGURA 2 – KIT DE BIOENSAIO COM PAPÉIS IMPREGNADOS, MODELO DA OMS

FONTE: A autora (2018)

LEGENDA: O tubo localizado à esquerda possui o papel impregnado com inseticida, enquanto o da direita é o tubo de descanso

Os bioensaios foram realizados em condição de temperatura controlada de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa média de 72 %. Os tubos de descanso foram mantidos em câmara tipo BOD sob fotoperíodo de 12:12 e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os bioensaios para cada concentração avaliada consistiram de, no mínimo, quatro repetições com 25 fêmeas expostas, totalizando no mínimo 100 fêmeas para cada concentração, incluindo grupos controle. A quantidade de fêmeas expostas a cada concentração de inseticida pode ser observada na TABELA 4.

TABELA 4. NÚMERO DE FÊMEAS EXPOSTAS EM CADA CONCENTRAÇÃO DE INSETICIDA PARA REALIZAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA

Concentração		Nº de fêmeas expostas
$\mu\text{g cm}^{-2}$	%	
20,0	0,80	135
25,0	1,10	270
32,5	1,30	125
35,0	1,40	147
35,5	1,42	142
Controle	0,00	119

5.2 BIOENSAIOS COM CONCENTRAÇÃO DISCRIMINANTE

5.2.1 Descrição do local de procedência de *Aedes aegypti*

As amostras de campo de *A. aegypti* foram obtidas do projeto de pesquisa “Inovação em produtos de controle e repelência do vetor e monitoramento de arbovírus”, desenvolvido na cidade de Paranaguá. Este projeto foi aprovado na chamada MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit/Nº 14/2016 - Prevenção e Combate ao vírus Zika.

O município de Paranaguá está localizado na região Sul do Brasil e à Sudeste do estado do Paraná, na Planície Litorânea, entre as latitudes 25,365°S e 25,735°S e longitudes 48,706°W e 48,277°W (MELLO; LOPES; ROSEGHINI, 2017) (FIGURA 3). Tem uma extensão de 826,431 km² e população estimada de 156.154 habitantes com uma densidade demográfica de 169,92 habitantes por km² (IBGE, 2017).

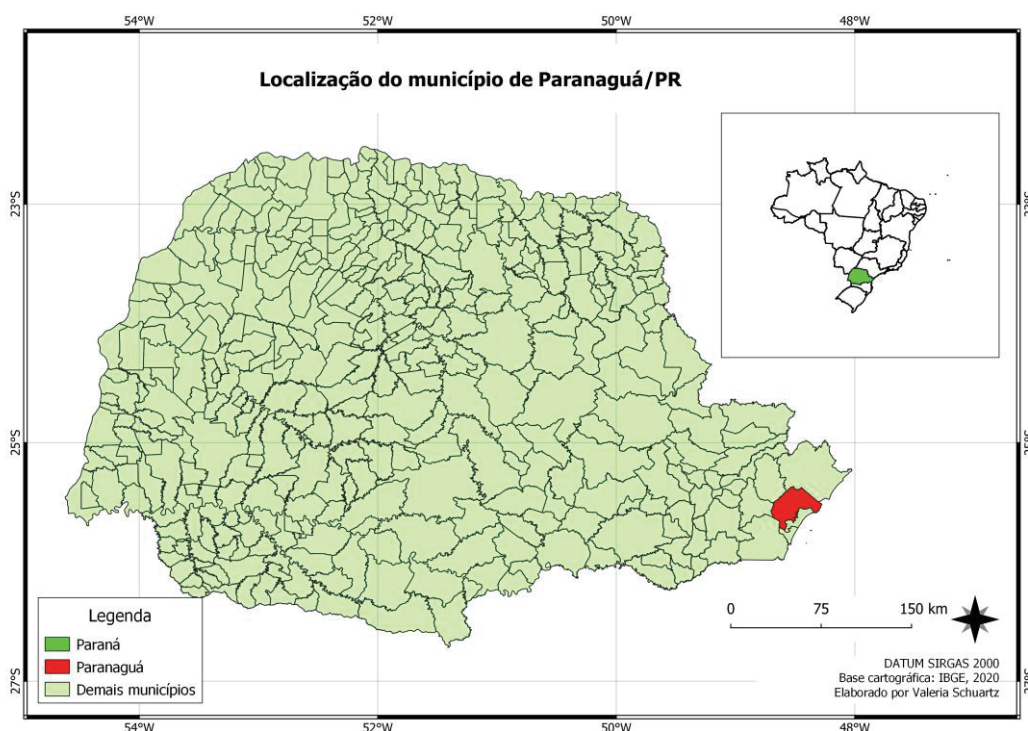


FIGURA 3. LOCALIZAÇÃO DA CIDADE DE PARANAGUÁ
FONTE: A autora (2021)

O relevo da cidade é composto pelas Planícies Litorânea e Fluvioamarinhas, Serra do mar, Morros costeiros e Serras isoladas e rampas de Pré-serras (MINERAIS

DO PARANÁ - MINEROPAR, 2006; MELLO; LOPES; ROSEGHINI, 2017), está a cinco metros acima do nível do mar e apresenta recursos hídricos importantes como a baía de Paranaguá e os rios Itiberê e Guaraguaçu (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2007).

A vegetação predominante constitui-se de Floresta Ombrófila Densa, Áreas de Formações Pioneiras com influência Marinha como Restingas e influência Fluviomarinha como Manguezais, Várzeas e Praturás (campos salinos) (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2007). Estão presentes na cidade seis unidades de conservação, sendo quatro integralmente no território e duas em parte, respectivamente: Parque Estadual da Ilha do Mel, Estação Ecológica da Ilha do Mel, Estação Ecológica do Guaraguaçu, Floresta Estadual do Palmito, Área de Proteção Ambiental Federal de Guaraqueçaba e Área de Proteção Ambiental Estadual de Guaratuba (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2007).

Segundo a classificação de Köppen, Paranaguá apresenta clima Subtropical Úmido Mesotérmico (Cfa) com temperatura média do verão acima de 22°C e no inverno inferior a 18°C. Os verões são quentes e concentram a maior quantidade de chuvas, entretanto não há estação seca definida, nem geadas frequentes (VANHONI; MENDONÇA, 2008).

A cidade de Paranaguá também apresenta importância econômica por comportar o Porto Dom Pedro II, o Porto de Paranaguá. Este mantém ligações e fluxo intenso de mercadorias com outros estados e países movimentando cargas de importação e exportação (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2007).

5.2.2 Coleta do material

A cidade de Paranaguá foi dividida em 16 estratos que abrangem a totalidade da área urbana. No processo de mapeamento, os estratos foram demarcados observando marcos de barreiras físicas como divisa (FIGURA 4). No total foram distribuídas 331 armadilhas nos estratos, com distância aproximada de 200 a 300 metros entre elas (FIGURA 4).

Para o presente estudo foram utilizados ovos coletados no mês de junho de 2018, resultando em uma única amostragem temporal e geográfica para os experimentos. As armadilhas permaneceram por quatro dias em campo, sendo colocadas em 08/06/2018 e recolhidas em 12/06/2018.

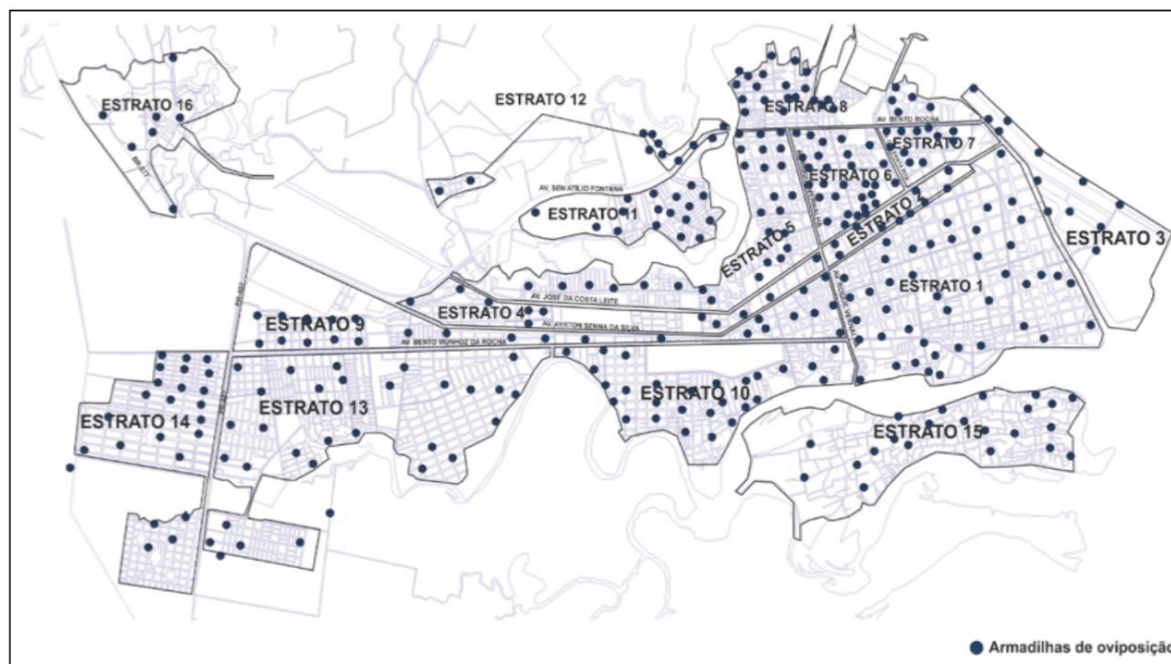


FIGURA 4. LOCALIZAÇÃO DAS ARMADILHAS OVITRAMPAS

LEGENDA: Representação esquemática da divisão da cidade de Paranaguá em estratos e localização das armadilhas do tipo ovitrampa distribuídas pela cidade durante a realização do projeto “Inovação em produtos de controle e repelência do vetor e monitoramento de arbovírus”

Os adultos que emergiram foram identificados e os exemplares de *A. aegypti* foram registrados por número de armadilha, estrato e sexo e colocados em gaiolas para o estabelecimento de um insetário. A representatividade de indivíduos que colaboraram para a diversidade genética das demais gerações deste insetário, bem como estrato e palhetas de origem podem ser vistas na FIGURA 4 e na TABELA 5. As coordenadas destas palhetas estão registradas no ANEXO I.

5.2.3 Obtenção de adultos

As armadilhas do tipo ovitrampa (FIGURA 5) utilizadas para obtenção dos ovos em campo foi proposta por Fay e Eliason em 1966 (FAY; ELIASON, 1966). Elas são compostas por um recipiente preto com capacidade de 900 mL, no qual é fixada uma palheta de Duratree, marca Eucatex®, de 14 cm x 3 cm, que fica parcialmente submersa em aproximadamente 250 mL água e serve como substrato para oviposição pelas fêmeas.

As armadilhas permaneceram em campo por quatro dias e, em seguida, foram recolhidas e encaminhadas para o Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae

e Chironomidae (LAMFIC) do departamento de Zoologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

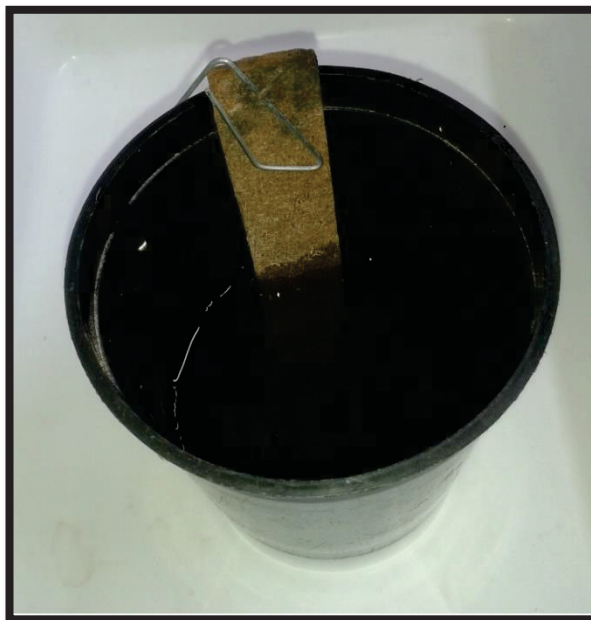


FIGURA 5 - ARMADILHA DE OVIPOSIÇÃO UTILIZADA EM CAMPO PARA OBTENÇÃO DE OVOS DE *Aedes*.
FONTE: A autora (2018)

TABELA 5. ORIGEM E REPRESENTATIVIDADE DE INDIVÍDUOS DE *Aedes aegypti* UTILIZADOS PARA ESTABELECIMENTO DE INSETÁRIO E OBTENÇÃO DA GERAÇÃO F1 E F2

Estrato	Palheta	Machos	Fêmeas	Total	Palheta (%)	Estrato (%)
1	2	0	1	1	0,16	8,24
1	4	3	10	13	2,10	
1	10	2	2	4	0,65	
1	12	26	7	33	5,33	
5	87	0	1	1	0,16	0,16
6	112	0	5	5	0,81	4,52
6	113	8	3	11	1,78	
6	115	3	4	7	1,13	
6	118	0	2	2	0,32	
6	120	0	3	3	0,48	6,14
7	137	9	8	17	2,75	
7	138	3	2	5	0,81	
7	142	12	4	16	2,58	
8	154	4	7	11	1,78	12,60
8	157	15	9	24	3,88	
8	162	1	13	14	2,26	
8	165	16	13	29	4,68	
9	171	15	2	17	2,75	5,98
9	179	3	5	8	1,29	
9	184	3	5	8	1,29	
9	188	0	4	4	0,65	
10	217	13	14	27	4,36	5,65
10	218	1	7	8	1,29	
11	221	0	1	1	0,16	
11	224	6	7	13	2,10	
11	226	20	36	56	9,05	18,26
11	229	17	19	36	5,82	
11	233	3	4	7	1,13	
12	238	13	13	26	4,20	
12	240	13	5	18	2,91	9,37
12	241	7	7	14	2,26	
13	267	19	26	45	7,27	
13	271	9	1	10	1,62	
14	282	2	1	3	0,48	5,82
14	284	6	11	17	2,75	
14	289	6	5	11	1,78	
14	291	4	1	5	0,81	
15	307	3	16	19	3,07	14,38
15	311	14	11	25	4,04	
15	312	15	3	18	2,91	
15	322	0	4	4	0,65	
15	324	11	12	23	3,72	
Total		305	314	619	100	100

Em laboratório, foram contabilizados os ovos sob microscópio estereoscópico (marca Zeiss, modelo Stemi SV 6, com iluminação integrada) e as palhetas foram colocadas individualmente em copos plásticos de 700 mL identificados com número de palheta e estrato. As palhetas foram submersas em água desclorada (água da torneira oxigenada por 48 horas) para a eclosão dos ovos, após a secagem completa das palhetas. As larvas foram alimentadas com ração triturada para alevinos Aqua line® Supra juvenil com 42% de proteína até alcançarem o estágio de pupa, quando foram transferidas para armadilhas de emergência de adultos.

Os adultos foram identificados e contabilizados por espécie e sexo. Os exemplares de *A. aegypti* foram colocados em gaiolas (30 x 30 x 30 cm) para estabelecimento de um insetário para gerar ovos de uma primeira geração, F1 e, posteriormente da geração F2. A variabilidade genotípica foi mantida uma vez que foram obtidos mais de 30 lotes de ovos, como recomenda a OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016), para garantir uma boa representatividade da população local. O estabelecimento de um insetário para a realização dos bioensaios e posterior avaliação da expressão gênica visou reduzir as fontes externas de variação e garantir maior comparabilidade entre os resultados e homogeneidade das amostras, além de aumentar a quantidade de indivíduos disponíveis para realizar os testes. Os adultos obtidos da geração F2, foram utilizados para os bioensaios de resistência ao inseticida.

A criação dos imaturos seguiu a mesma metodologia para as gerações F1 e F2 obtidas da população de Paranaguá. Os ovos foram colocados para eclodir em recipientes água desclorada por 48h. Aproximadamente 500 larvas foram transferidas para bandejas com 2L de água desclorada, repostas quando necessário devido a evaporação. A ração líquida utilizada para alimentação das larvas foi preparada na proporção de 3,16 g de ração em pó para alevinos Aqua line® Supra juvenil com 42% de proteína para cada 21 mL de volume final. A quantidade de ração fornecida diariamente para cada 500 larvas em 2L de água, consecutivamente, do dia um ao dia nove de vida das larvas ou até a formação de pupas foi a seguinte: 0,00 mL, 1,25 mL, 0,00 mL, 2,50 mL, 3,80 mL, 5,00 mL, 4,00 mL, 2,50 mL, 2,00 mL e 0,00 mL. Os imaturos foram mantidos no interior de câmara tipo BOD com temperatura controlada de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12:12.

As pupas da geração F1 foram transferidas para gaiolas para a emergência de adultos e, posteriormente, obtenção de ovos da geração F2. As pupas da geração

F2 foram separadas manualmente com pipeta plástica entre machos e fêmeas utilizando o critério de tamanho. Os machos que emergiram foram sacrificados por congelamento e armazenados em freezer -80°C e as pupas separadas como fêmeas foram colocadas em gaiolas para emergência à fase adulta. Os adultos que emergiram foram confirmados como fêmeas ou descartados se fossem machos. As fêmeas foram alimentadas com solução de mel 10 % e foram utilizadas para os bioensaios entre um e três dias de vida.

A alimentação dos adultos no insetário consistiu de uma solução açucarada de mel a 10 % e o repasto sanguíneo foi realizado duas vezes por semana utilizando camundongos da linhagem *Swiss*, com autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas (Universidade Federal do Paraná) sob o número 719. As fêmeas realizavam a oviposição em papéis filtro parcialmente submersos em água que eram coletados duas vezes por semana, secos em temperatura ambiente por 24 horas e acondicionados em sacos de papel. Os adultos foram mantidos em sala com temperatura de 23±3°C e luz natural.

As fêmeas da linhagem *Rockefeller* foram utilizadas como controle de todos os experimentos. A metodologia de criação das larvas e adultos foi a mesma citada acima. Os adultos foram mantidos em condições de temperatura de 25±3°C e iluminação natural antes da realização dos bioensaios.

5.2.4 Impregnação dos papéis

Os testes de sensibilidade ao inseticida foram realizados utilizando o método de papéis impregnados da OMS de acordo com suas instruções (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Os papéis foram impregnados com o inseticida malation (Pestanal® 98% Sigma-Aldrich, lote: BCBS8709V, validade: 19/08/2021), seguindo os mesmos procedimentos detalhados anteriormente.

Para a realização dos bioensaios com a população de Paranaguá, os papéis foram impregnados na concentração discriminante determinada neste trabalho para a população e as condições locais, de 3,41 % (TABELA 3). Para isto, foram utilizados 23,9 mg de malation em 607 mg de azeite de oliva, acrescidos de 700 mL de acetona. O controle foi composto por 630 mg de azeite de oliva e 700 mL de acetona.

Também foram impregnados papéis filtro com malation a 5 %, como citado em outros artigos e como concentração recomendada para mosquitos *Anopheles* pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Para obter a concentração de 5 % foram utilizados 35 mg de malation em 595 mg de azeite de oliva, acrescidos de 700 mL de acetona. Os procedimentos de impregnação dos papéis foram os mesmos apresentados anteriormente.

5.2.5 Bioensaios com papel impregnado

Os bioensaios foram realizados em condição de temperatura controlada de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa média de $68,5\pm 18,5$ %. As exposições no kit da OMS foram realizadas durante nove dias, abrangendo os horários entre 8 e 18 horas. Os tubos de descanso foram mantidos em câmara tipo BOD sob fotoperíodo de 12:12 horas e temperatura média de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Foram avaliadas 1518 fêmeas da geração F2 oriunda de Paranaguá sob a CD de 3,41 %, sendo 1197 expostas ao inseticida e 321 do grupo controle. Da mesma forma, foram expostas também 78 fêmeas do insetário de *Rockefeller*, sendo 55 nesta concentração e 23 como controle deste grupo. Cada papel nesta concentração foi utilizado 25 vezes. De acordo com o manual da OMS, papéis impregnados com inseticida não piretróide podem ser utilizados mais de 20 vezes sem perder a eficácia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Para a concentração de 5 % de inseticida, foram testadas 365 fêmeas da geração F2 de Paranaguá, sendo 290 expostas ao malation e 75 expostas ao papel controle. Foram testadas também 235 fêmeas *Rockefeller* como controle do experimento, sendo 81 expostas ao inseticida e 154 como controle deste grupo. Os papéis impregnados nesta concentração foram utilizados 12 vezes.

5.2.6 Armazenamento das amostras

As fêmeas da população F2 de Paranaguá sobreviventes após 24 horas aos bioensaios de exposição ao inseticida e ao papel controle foram mortas por congelamento em freezer – 20°C e armazenadas em grupos de aproximadamente 50 indivíduos.

Fêmeas que não foram expostas nos bioensaios e machos foram mortos por congelamento e armazenados em grupos separados por sexo. Estas fêmeas consistiram no controle não exposto, que foram utilizadas, posteriormente, na expressão gênica.

O armazenamento de todos os indivíduos foi feito em freezer -80°C para garantir a integridade dos ácidos nucleicos a serem trabalhados posteriormente, na expressão gênica.

5.3 EXPRESSÃO GÊNICA

5.3.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit de extração RNeasy® Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante para tecidos animais (disponível em: www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en). A eluição do RNA foi realizada utilizando 30 µL de água livre de RNase.

A identificação das amostras de fêmeas de Paranaguá foi: sobreviventes à exposição ao inseticida (PV); expostas ao papel controle (PC); e controle, não expostas (PN). E o grupo proveniente do insetário *Rockefeller* é identificável como: controle, não expostas (RN).

Foi realizada a extração de RNA de 60 fêmeas dos grupos RN, PN e PC e 124 fêmeas do grupo PV.

5.3.2 Quantificação das amostras de RNA

O RNA extraído foi quantificado e a pureza das amostras analisada em espectrofotômetro Nanodrop™ 2000. A pureza foi obtida através da razão dos valores de comprimento de onda 260 nm/ 280 nm e as amostras foram consideradas competentes para uso se apresentassem a razão 260 nm/ 280 nm de 1,8 ou superior (ANEXO II) (TAYLOR et al., 2019).

Após o tratamento com DNase (vide abaixo, 6.3.4 Tratamento das amostras), as amostras foram quantificadas novamente para garantir que a quantificação fosse

precisa para a normalização das amostras e, posteriormente, na expressão gênica, uma vez que este é o último ponto possível de quantificação antes da qPCR. Para esta quantificação foi utilizada a técnica de fluorometria, uma vez que este é um método que utiliza intercalante de ácidos nucleicos e aumenta a precisão da quantificação (BUSTIN et al., 2009). Foi utilizado o kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega) seguindo recomendações do fabricante (disponível em: www.promega.com.br/products/rna-analysis/dna-and-rna-quantitation/quantifluor-dsdna-system/) e analisada a fluorescência no aparelho Quantus™ Fluorometer (Promega).

5.3.3 Avaliação de integridade do RNA

A integridade do RNA utilizado foi avaliada através da realização de corrida eletroforética com parâmetros de 80 V, 160 mA por 30 minutos, utilizando gel de agarose 1 % com o tampão TAE 1 X. As amostras que apresentaram rastros de degradação foram excluídas do processo.

5.3.4 Tratamento das amostras

Todas as amostras de RNA foram tratadas utilizando *Deoxyribonuclease I* (DNase I) (Sigma Aldrich) e seu tampão de acordo com instruções do fabricante (disponível em: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ampd1?lang=pt®ion=BR). Devido à baixa quantidade de ng μL^{-1} de RNA obtidas, foram tratados 500 ng, 250 ng ou todo o RNA obtido, conforme a quantidade de RNA disponível para cada amostra. Para as reações, com volume final de 33 μL , foram utilizados 24 μL de amostra de RNA, 3 μL da enzima DNase I e 3 μL do seu tampão. A mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, e acrescentou-se 3 μL da solução de *Stop Solution* (Sigma Aldrich). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 70°C por 10 minutos e colocadas no gelo.

O tratamento do RNA com DNase I foi avaliado numa corrida eletroforética com parâmetros de 80 V, 160 mA por 30 minutos, utilizando gel de agarose 1 % com o tampão TAE 1 X e observada a presença de uma única banda, o RNA.

5.3.5 Elaboração de cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante (disponível em: www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814#/4368814). Para tratamento de 14,2 µL de RNA tratado, acrescentou-se 2 µL de *Buffer* 10 X, 0,8 µL de dNTP Mix 25 X, 2 µL *Random Primer*, 1 µL de *Reverse Transcriptase*, de forma que o volume final total foi de 20 µL. A quantidade de RNA utilizado para a síntese de cDNA foi normalizada conforme o RNA total tratado disponível, sendo a quantidade total de cDNA ao final do processo, em 20 µL, de 200, 100, 80, 50, 40, 30 ou 20 ng.

Posteriormente, as amostras foram colocadas em termociclador seguindo a rampa de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Em seguida as amostras de cDNA foram preservadas em freezer - 20°C.

Para cada rodada de amostras em que foi realizada a síntese de DNA complementar, foi feito um controle de transcriptase reversa (RT) negativo, o qual recebe todos os reagentes desta etapa, menos a enzima Transcriptase Reversa. Esta etapa é importante, uma vez que é o controle de qualidade de que o DNA genômico foi todo eliminado até este momento, uma vez que após a síntese de cDNA, não há mais diferenciação.

5.3.6 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores foram desenhados para as três enzimas de interesse: acetilcolinesterase (*ace-1*), esterase β (*CCEae3A*) e citocromo oxidase P₄₅₀ (*CYP6N12*). O desenho dos iniciadores, bem como informações adicionais podem ser observados na TABELA 6.

Dois genes de referência foram utilizados considerando a possibilidade de não serem completamente estáveis ou ocorrer regulação ocasional na sua expressão (RIEDEL *et al.*, 2014). A Actina e Proteína Ribossomal S17 foram utilizados, uma vez que são apontados como a melhor combinação para fêmeas adultas de *A. aegypti* em estudos de expressão gênica (DZAKI *et al.*, 2017).

A sequência dos genes referentes às proteínas de interesse foi obtida no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e os oligonucleotídeos foram

desenhados utilizando o programa Primer3Plus. As sequências dos oligonucleotídeos referência, Actina e Proteína Ribossomal S17, foram obtidos de (DZAKI *et al.*, 2017).

Para resultados confiáveis em expressão gênica, além do tratamento adequado da extração de RNA e o uso de DNase para garantir que não há DNA genômico na amostra de cDNA, pode-se utilizar um iniciador na união éxon-éxon. Um dos iniciadores sobrepõe uma junção éxon-éxon e o outro é interior a um dos éxons, de forma que o iniciador reconhecerá apenas o mRNA maduro e não DNA genômico (VANDENBROUCKE, 2001). Desta forma, um dos oligonucleotídeos para esterase β e citocromo oxidase P₄₅₀ foram desenhados em junção éxon-éxon. Em relação aos demais pares de oligonucleotídeos, estão desenhados dentro de éxons, garantindo a amplificação do RNA mensageiro, mas não excluindo a possibilidade de amplificar DNA genômico. Por isso o controle negativo de cDNA citado anteriormente é importante e garante que não há contaminação com DNA genômico.

5.3.7 Validação e otimização dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram validados, inicialmente, em PCR convencional para garantir que estavam amplificando adequadamente. Para a reação de PCR com volume final de 10 μ L, foram utilizados 1,2 μ L de Buffer (10 X), 0,6 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0,25 μ L de dNTP (25 mM), 1 μ L de primer *forward* e *reverse* (10 μ M), 4,85 μ L de água ultrapura (MilliQ) e 1 μ L de cDNA. A Rampa de temperatura utilizada foi de 94°C por cinco minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, gradiente de temperaturas de anelamento de 45°C a 65°C por 30 segundos e extensão de 72°C por cinco minutos; e 72°C por cinco minutos.

Uma vez identificada a temperatura de anelamento ideal sem a formação de produtos de PCR inespecíficos, os oligonucleotídeos foram testados também em reação de qPCR para garantir que ocorria apenas a amplificação de um único fragmento, sem a formação de dímeros dos oligonucleotídeos.

TABELA 6. INFORMAÇÕES SOBRE OS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA PCR EM TEMPO REAL

Enzimas	Nome	Iniciadores (5'-3')	Amplicon (pb)	Hibridação	ID (GenBank)
Acetilcolinesterase	Ace-1	F GCAATCGGGATGCATTGGAC	81	Exon 7	AAEL000511
		R CTGCATATCGCTGGGCAAC		Exon 7	
Citocromo oxidase P ₄₅₀	CYP6N12	F GATCAATGTATCAACGAGTCCC	165	Exon 1-2	AAEL009124
		R GGGATAGTATTCTGCGTCGT		Exon 2	
Esterase β	CCEae3A	F GCAATATGTCAGTCGGGAGT	129	Exon 1	AAEL005112
		R GAGGGTTTCGTAAATTTTCATCATCG		Exon 1-2	
Actina 5C	Act-5C	F CGTTCTGTGACATCAAGGAAA	175	Exon 2	AAEL011197
		R GAACGATGGCTGGAAGAGAG		Exon 2	
Proteína Ribossomal S17 40S	RPS17	F AAGAA GTGGCCCATCATTTCCA	200	Exon 2	AAEL004175
		R GGTCTCCGGGTCGACTTC		Exon 3	

A quantidade de oligonucleotídeos a ser utilizada por reação de qPCR foi otimizada fixando uma quantidade de cDNA (10 ng por reação) e variando a concentração dos oligonucleotídeos, de forma a obter a melhor amplificação sem formação de dímeros. Para isto, reações de qPCR foram realizadas variando a quantidade de oligonucleotídeos (10 µM) de 0,3 µL a 0,8 µL o par e alternando de 0,3 µL a 0,8 µL cada um dos iniciadores do par.

5.3.8 Eficiência de reação de qPCR

A eficiência de reação de qPCR foi realizada através de curva de dissociação, utilizando a concentração fixa de 0,8 µL de cada *primer* (10 µM) e um gradiente de concentrações de cDNA com diluição seriada de 1:5 (10 ng, 2 ng, 400 pg, 80 pg, 16 pg, e 3,2 pg). A fórmula utilizada para o cálculo da eficiência de reação foi:

$$\text{Eficiência} = 10^{-1/\text{slope}_1}$$

Os valores de eficiência de reação, que indica que não há contaminantes e a reação está otimizada, estão entre 90 % e 110% , como recomendado (TAYLOR *et al.*, 2019) (TABELA 7). O valor do coeficiente de determinação (R^2), que indica a linearidade dos dados, o quão bem a diluição seriada se correlaciona com os valores de Cq obtidos experimentalmente, foram maiores que 0,98 (BIO-RAD, 2013) (TABELA 7).

TABELA 7. VALORES DE EFICIÊNCIA DE REAÇÃO E R^2

Par de oligonucleotídeos*	Eficiência (%)	R^2
<i>Ace-1</i>	101,76	0,9840
<i>CYP6N12</i>	96,59	0,9894
<i>CCEae3A</i>	100,57	0,9953
<i>Act-5C</i>	97,34	0,9948
<i>RPS17</i>	100,44	0,9815

NOTA: * Para sequência, vide TABELA 6

5.3.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qPCR)

As reações de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foram realizadas utilizando 2 µL de cDNA (1 ng por reação, nas amostras de expressão gênica), 5 µL da solução PowerUp SYBR Green Master Mix® (Thermo Fisher Scientific), 0,8 µL de iniciador Senso, 0,8 µL de iniciador Anti-senso e 1,4 µL de água ultrapura (Milli-Q). No controle negativo foi adicionado 2 µL de água ultrapura no lugar de cDNA.

As reações de qPCR foram realizadas utilizando um termociclador Rotor Gene Q5 Plex (Qiagen). A rampa de temperatura utilizada foi de 50°C por 2 minutos de espera, 95°C por 2 minutos em desnaturação inicial, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, hibridação a 53°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos; e a extensão final, o *melt*, foi de 54°C a 95°C, aumentando 1°C a cada 5 segundos.

Todas as amostras do controle RT negativo foram rodadas na qPCR não apresentando amplificação, o que confirmou a ausência de DNA genômico nas amostras.

5.3.10 Amostras destinadas para a expressão gênica

Para as reações de expressão gênica foram utilizadas 10 amostras Controle *Rockefeller*, 14 amostras Controle não exposto de Paranaguá, 10 amostras de Controle exposto e 24 amostras de fêmeas sobreviventes à exposição.

Todas as reações de qPCR foram rodadas em triplicata e continham um controle de reação (água). Todos os genes de interesse foram rodados simultaneamente com ambos os genes de referência para evitar variações do método e dos instrumentos entre as corridas. A diferença de Cts considerada aceitável entre as réplicas foi de, no máximo, 0,5 (BIO-RAD, 2013).

5.3.11 Análise dos resultados

A expressão gênica relativa foi estimada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ comparativo entre os genes alvo, que assume uma eficiência de reação de 100 % entre os genes (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), adaptado para a utilização de dois genes de referência (RIEDEL *et al.*, 2014).

A remoção de outliers foi realizada com o programa online *Outlier calculator GraphPad* (disponível em www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/), com nível de significância de $\alpha=0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 5*. A normalidade dos dados foi analisada através do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual avaliou os dados como não paramétricos e, portanto, foi realizada a comparação entre os grupos com os testes de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, sendo o nível de significância utilizado de $\alpha=0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DOSE-RESPOSTA E CONCENTRAÇÃO DISCRIMINANTE

A mortalidade registrada para todas as concentrações testadas nas fêmeas *Rockefeller* e utilizadas para a realização da curva dose-resposta está representada na TABELA 8.

TABELA 8. PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DAS FÊMEAS SUSCETÍVEIS DE *Aedes aegypti* EXPOSTAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MALATION PARA REALIZAÇÃO DA CURVA DOSE- RESPOSTA

Concentração		Quantitativo de fêmeas			
$\mu\text{g cm}^{-2}$	%	Vivas	Mortas	Total	Mortalidade (%)
20,0	0,80	109	26	135	19,26
25,0	1,10	139	131	270	48,52
32,5	1,30	31	94	125	75,20
35,0	1,40	6	141	147	95,92
35,5	1,42	7	135	142	95,07
Controle	0,00	119	0	119	0,00

A quantidade de ingrediente ativo de malation necessária para matar 99 % (CL 99) das fêmeas *Rockefeller* foi de 42,7 $\mu\text{g i.a cm}^{-2}$ (38,0 – 51,2 $\mu\text{g i.a cm}^{-2}$), equivalente a 1,7 % (1,5 % – 2,0 %) de malation (TABELA 9). A curva de mortalidade, bem como os limites inferiores e superiores, em resposta às concentrações de inseticida está representada na FIGURA 6. A mortalidade dos controles de todos os experimentos foi inferior a 5 %, dispensando a correção dos valores de mortalidade pela fórmula de Abbott (SILVA *et al.*, 2007) para os testes de suscetibilidade com inseticida.

TABELA 9 – DADOS DA RESPOSTA DE FÊMEAS *ROCKEFELLER* DE *Aedes aegypti* ÀS CONCENTRAÇÕES LETAIS DE MALATION

Insetário	N	Inclinação (SD)	CL ₉₉ (IC95) $\mu\text{g i.a cm}^{-2}$	CL ₉₉ (IC95) %	X ²	GL	p
<i>Rockefeller</i>	819	8,184±0,64	42,70 (38,00 – 51,20)	1,70 (1,50 – 2,00)	3,22	3	0,64

A concentração discriminante estabelecida foi de 3,41 %, que corresponde a uma quantidade de 85,25 $\mu\text{g i.a cm}^{-2}$ de ingrediente ativo.

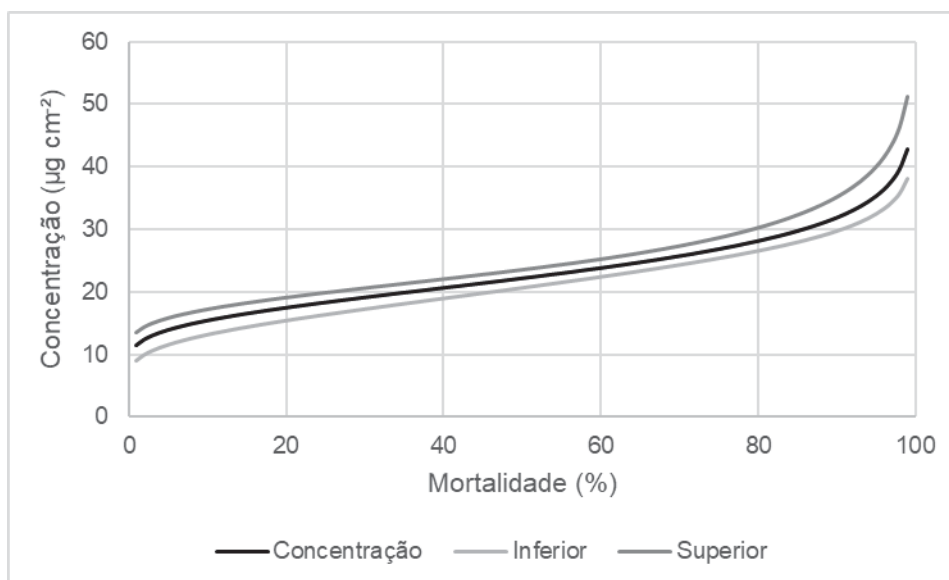


FIGURA 6. CURVA DE MORTALIDADE DE FÊMEAS *ROCKEFELLER* DE *Aedes aegypti* QUANDO EXPOSTA AO MALATION
 LEGENDA: representação da curva de mortalidade e limites superiores e inferiores em relação às diferentes concentrações de inseticida do insetário referência *Rockefeller*.

6.2 BIOENSAIOS COM POPULAÇÃO DE *Aedes aegypti* DE PARANAGUÁ

Das 1518 fêmeas de *A. aegypti* da população de Paranaguá expostas ao inseticida na concentração discriminante, 401 sobreviveram e 796 morreram totalizando uma mortalidade de 66,5 % (TABELA 10), sendo a população considerada resistente de acordo com os critérios da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Fêmeas de *A. aegypti* do insetário de *Rockefeller* também submetidas a esta concentração como controles, tiveram mortalidade de 100 %, como esperado.

Na concentração de 5 % de inseticida, das 290 fêmeas expostas, nove sobreviveram e 281 morreram totalizando uma mortalidade 96,89 % (TABELA 10). As fêmeas da população *Rockefeller* expostas a esta concentração como controles tiveram uma mortalidade de 100 % como esperado.

A mortalidade dos controles de todos os experimentos foi inferior a 5 %, dispensando a correção dos valores de mortalidade pela fórmula de Abbott (SILVA *et al.*, 2007) para os testes de suscetibilidade com inseticida.

TABELA 10. RESULTADO DOS BIOENSAIOS COM AS POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* EXPOSTAS AO INSETICIDA MALATION UTILIZANDO A TÉCNICA DE PAPÉIS IMPREGNADOS DA OMS

Grupo	Concentração	Bioensaios	N	Total	Mortalidade (%)
Paranaguá (F2)	3,41 %	Sobreviventes Mortas	401 796	1197	66,50
	0,00 %	Controle	317	317	0,01
<i>Rockefeller</i>	3,41 %	Sobreviventes Mortas	0 55	55	100,00
	0,00 %	Controle	23	23	0,00
Paranaguá (F2)	5,00 %	Sobreviventes Mortas	9 281	290	96,89
	0,00 %	Controle	75	75	0,00
<i>Rockefeller</i>	5,00 %	Sobreviventes Mortas	0 81	81	100,00
	0,00 %	Controle	154	154	0,01

6.3 EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS EM INSETOS RESISTENTES

Os níveis de expressão gênica da acetilcolinesterase (FIGURA 7A) e esterase β (FIGURA 7B) não apresentaram diferença significativa entre as fêmeas resistentes (PV) e as fêmeas dos grupos controle (RN, PN e PC). Os resultados indicam que a expressão gênica destas enzimas não foi alterada após exposição ao malation nas fêmeas resistentes (PV). Além disso, também não houve diferença significativa da expressão gênica entre os grupos controle de Paranaguá (PN e PC) e o controle *Rockefeller* (RN).

A expressão de citocromo oxidase P₄₅₀ das fêmeas expostas ao malation (PV) aumentou de forma significativa quando comparada exclusivamente com a expressão das fêmeas não expostas (PN) (FIGURA 7C). A expressão entre as fêmeas controle de Paranaguá (PC e PN) e as fêmeas controle *Rockefeller* (RN) foram semelhantes entre si.

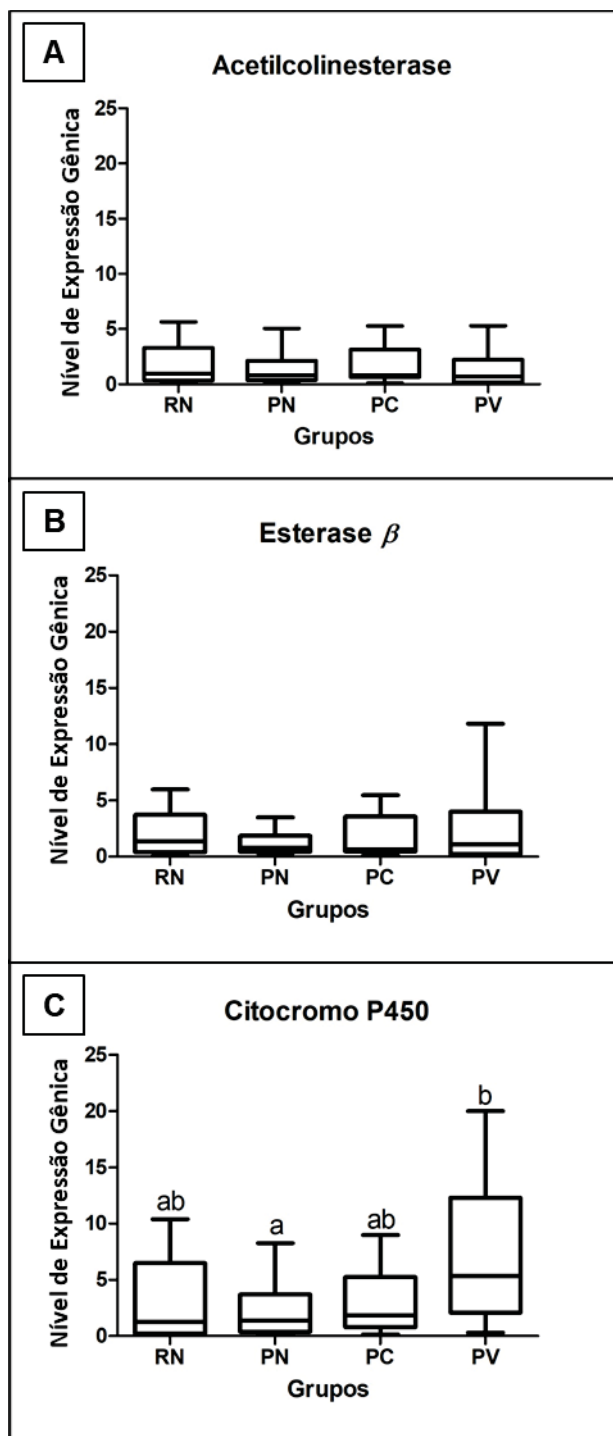


FIGURA 7. EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS ESTUDADAS

LEGENDA. Expressão gênica de fêmeas de *Aedes aegypti* das enzimas (A) acetilcolinesterase, (B) esterase β (C) citocromo P₄₅₀. **RN**: controle *Rockefeller*. **PN**: controle de Paranaguá. **PC**: controle solvente de Paranaguá. **PV**: resistentes, expostas ao malation nos bioensaios de suscetibilidade (concentração: 3,41 %).

7 DISCUSSÃO

A recente epidemia de dengue em Paranaguá, entre 2015 e 2016, levou à necessidade do uso de produtos químicos na tentativa de reduzir a densidade vetorial induzindo a pressão de seleção nos vetores ao princípio ativo utilizado. Dos produtos recomendados pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), o malation era o inseticida utilizado neste momento no país e em Paranaguá, à escolha do Ministério da Saúde. O monitoramento da resistência é necessário, portanto, para averiguar se a população de *A. aegypti* avaliada está sendo selecionada para a resistência ao inseticida utilizado e, com isso, evidenciar a necessidade da troca de princípio ativo se necessário, com objetivo de evitar a perda da sua efetividade na redução da densidade vetorial.

7.1 CONCENTRAÇÃO DISCRIMINANTE

Uma vez que o controle de vetores depende da utilização de inseticidas em decorrência de falhas em outros métodos de controle da população dos vetores, o monitoramento da resistência é fundamental para evitar a transmissão de arboviroses. Assim, a determinação e utilização da concentração discriminante é uma importante ferramenta para detecção e monitoramento de resistência em populações de vetores em programas que utilizam inseticidas para seu controle (JUNTARAJUMNONG *et al.*, 2012; RAHIM *et al.*, 2017).

Após a padronização do método de bioensaios com papel impregnado, concentrações discriminantes para vários inseticidas em adultos de *Anopheles* foram estabelecidas já no primeiro manual de apoio, entretanto contemplava apenas bioensaios larvais para *Aedes* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1976). O estabelecimento da concentração discriminante é uma forma de simplificar o monitoramento rotineiro da resistência bem como reduzir custos e aumentar a eficiência dos testes, uma vez que é fornecido apenas uma concentração em contraste com a testagem de várias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1976; RAHIM *et al.*, 2017). Entretanto as concentrações discriminantes documentadas para vários vetores e inseticidas devem ser apenas um guia para a determinação de resistência em campo, sendo recomendado o estabelecimento de valores de

referência para as populações locais suscetíveis sempre que possível (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992; MACORIS *et al.*, 2005).

Neste estudo foi estabelecida a concentração discriminante de 3,41 % de malation sob as condições locais para a qual foi testada a população de Paranaguá a partir de uma curva dose-resposta utilizando um insetário referência *Rockefeller*, linhagem mantida em laboratório por mais de 130 anos e, portanto, sensível a inseticidas (KUNO, 2010).

A concentração obtida (3,41 %) foi quatro vezes maior do que a recomendada pela OMS (0,8 %) para a realização dos bioensaios com malation em adultos de *A. aegypti* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992, 2016). Em comparação com a concentração obtida neste estudo, a utilização da quantidade recomendada pela OMS pode superestimar a resistência ao ser utilizada nas populações avaliadas.

Neste trabalho a concentração de 0,8 % de inseticida foi testada em fêmeas suscetíveis do insetário de *Rockefeller*, entretanto não causou a mortalidade esperada de 100 %, uma vez que a concentração discriminante deve ser o dobro da concentração mínima necessária para levar à morte a totalidade dos mosquitos suscetíveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Resultado semelhante foi obtido no trabalho de MACORIS *et al.* (2007), onde foi testada a concentração de 0,8 % em indivíduos de *Rockefeller*, entretanto a mortalidade também foi inferior a 100 %.

RAHIM *et al.*, (2017) também delimitaram a concentração discriminante, de 2,4 % para o malation utilizando curva dose-resposta em uma população de *Aedes albopictus* (Malásia). Embora seja outra espécie, a concentração obtida foi mais próxima à deste trabalho do que a recomendada pela OMS e utilizada em estudos de resistência, tanto 0,8 % quanto 5 %.

Embora os documentos da OMS recomendem a utilização da concentração de 0,8 % para *Aedes* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992, 2016), a maioria dos trabalhos que avaliaram a resistência de populações de *A. aegypti* em várias regiões do mundo utilizaram a concentração discriminante recomendada para mosquitos *Anopheles*, de 5 % (KARUNARATNE; HEMINGWAY, 2001; OCAMPO *et al.*, 2011; ARSLAN *et al.*, 2016; KAMGANG *et al.*, 2017; BHARATI; SAHA, 2018a; SONI *et al.*, 2018). De outra forma, menos trabalhos foram encontrados utilizando a concentração 0,8 % (MACORIS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2018), 0,75 % (KARUNARATNE *et al.*, 2013) e 0,7 % (HAYD *et al.*, 2020). Assim, a concentração utilizada pela maioria dos

trabalhos de avaliação da resistência em *Aedes* também difere da obtida neste trabalho, entretanto pela maior concentração de inseticida.

É importante salientar que neste estudo também foi realizada a exposição dos mosquitos de Paranaguá à concentração de 5 % obtendo resposta sobre a resistência diferente da concentração discriminante estabelecida no presente estudo. A primeira fornecendo uma resposta de possível resistência a ser confirmada e a segunda, resistência confirmada seguindo o manual da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Desta forma, é evidente que a concentração discriminante utilizada afeta diretamente no resultado do nível de resistência nas populações de *A. aegypti* ao malation. CDs de concentrações mais baixas podem aumentar a sensibilidade na detecção da resistência, entretanto podem sobreviver organismos não resistentes nos bioensaios e superestimar o nível de resistência. De outra forma, CDs de concentrações mais altas podem não abranger todos os indivíduos que apresentam algum grau de resistência, subestimando o nível de resistência da população amostrada (MACORIS *et al.*, 2005).

A resposta dos bioensaios de suscetibilidade é importante e crítica para que, nos programas de monitoramento, seja detectada a resistência e possam ser alterados os padrões das respostas fisiológicas nos vetores (JUNTARAJUMNONG *et al.*, 2012). Contudo, apenas a CD não é capaz dar a resposta definitiva sobre resistência de uma população amostrada, sendo apenas uma evidência da diminuição da suscetibilidade dos mosquitos. Além disso, é essencial que sejam analisados dados de campo como histórico de aplicação de inseticidas e pressão de seleção a eles e realizadas análises bioquímicas e moleculares para garantir o diagnóstico da resistência (MACORIS *et al.*, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

7.2 RESISTÊNCIA AO MALATION

O litoral do estado do Paraná, até 2014, não registrava a ocorrência de epidemias de dengue, entretanto entre 2015 e 2016, no município de Paranaguá, ocorreu um número elevado de casos de dengue e ocorrência de óbitos (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2016a). Esta situação colocou em alerta todos os municípios do litoral, que abarcam população fixa de residentes de aproximadamente 300 mil pessoas (IBGE, 2021).

A ocorrência desta epidemia coloca em evidência a dificuldade de controle do vetor (SMITH *et al.*, 2012; ACHEE *et al.*, 2015), situação que pode levar ao uso mais intensivo de inseticidas, muitas vezes tornando necessário a aplicação mais vezes ao ano do que o recomendado pelo Ministério da Saúde para tentar reduzir a densidade do vetor (GARCIA *et al.*, 2018; LEANDRO *et al.*, 2020). Nos anos posteriores, entre 2017 e 2018, período que antecede a realização deste estudo, a elevação da densidade vetorial também levou ao aumento da quantidade de inseticida utilizada no município a fim de evitar a ocorrência de uma nova epidemia e mortes (FOLHA DO LITORAL, 2017, 2018). Até o momento, não havia sido realizado nenhum estudo sobre a avaliação da suscetibilidade da população de *A. aegypti* ao malation, inseticida utilizado durante e nos anos que se seguiram à epidemia de 2015/2016, em Paranaguá, (G1 PR, 2016; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2016a; FOLHA DO LITORAL, 2017, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020). Logo, diante da ausência de informações do passado, não é possível avaliar a situação de suscetibilidade aos inseticidas neste momento, entretanto, é possível que ações esporádicas de controle químico ou introdução de mosquitos avindos de outras localidades tenham favorecido a seleção de indivíduos resistentes neste período e posteriormente. Além disso, aplicações registradas de malation nos anos que se seguiram à epidemia podem ter favorecido a seleção de resistência nesta população.

A realização de bioensaios com papel impregnado a uma concentração discriminante obtida neste trabalho mostrou que a população de *A. aegypti* procedente de Paranaguá em 2018, estava resistente ao malation.

Assim como neste estudo, a resistência ao malation em mosquitos *A. aegypti* já foi registrada em vários países do mundo (ARSLAN *et al.*, 2016; FRANCIS *et al.*, 2017; HAMID *et al.*, 2017; SONI *et al.*, 2018; CAMPOS *et al.*, 2020; GUIDEZ *et al.*, 2020; LÓPEZ-SOLÍS *et al.*, 2020). No Brasil, estudos de resistência mais antigos, anteriores à reintrodução do malation no controle de vetores haviam registrado populações resistentes devido ao uso intensivo deste inseticida há mais de duas décadas, no Nordeste e Sudeste em 1999 (MACORIS *et al.*, 2007) e em municípios do estado do Rio de Janeiro (LIMA *et al.*, 2003).

Entretanto, após a reintrodução do malation, entre 2009 e 2011, para o controle de *A. aegypti*, há poucos trabalhos que avaliaram o estado da resistência de populações do vetor no país a este inseticida. Recentemente foi registrada a

suscetibilidade em algumas populações no Ceará e Sergipe (VIANA-MEDEIROS *et al.*, 2017) e algumas cidades do Rio de Janeiro (DOS SANTOS *et al.*, 2020; RAHMAN *et al.*, 2021).

Outros estudos, no entanto, encontraram populações de *A. aegypti* que apresentaram desenvolvimento de resistência ao malation, como um estudo realizado em escala nacional (CAMPOS *et al.*, 2020) e um realizado em Roraima, que indicou redução da sensibilidade ao malation após, apenas, dois anos de uso (HAYD *et al.*, 2020).

Após aproximadamente dez anos de uso do malation em escala nacional (VALLE *et al.*, 2019), foi realizado um monitoramento da resistência ao malation em *A. aegypti* entre 2017-2018, evidenciando que a resistência está disseminada por todo o país (CAMPOS *et al.*, 2020), corroborando com este estudo sobre a resistência a este inseticida. A obtenção destes resultados evidencia a necessidade da troca de princípio ativo no sentido de evitar que a resistência se estabeleça e seja irreversível (CAMPOS *et al.*, 2020). Esta foi realizada em 2019, sendo substituído pela mistura de Imidacloprida e praletirina (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019). Entretanto, a situação é crítica, uma vez que além deste, só estão disponíveis para uso em saúde pública piretróides, aos quais também já foi detectada resistência em nível nacional (VALLE *et al.*, 2019), e o malation (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Este cenário reforça a necessidade de reduzir a dependência do controle químico do vetor, utilizando métodos mais naturais e seletivos, reduzindo passivos ambientais e danos à saúde humana e animal (NUNES *et al.*, 2021).

No Paraná, a resistência foi identificada nas cidades de Foz do Iguaçu (CAMPOS *et al.*, 2020; LEANDRO *et al.*, 2020), Londrina e Maringá, além de resistência sugerida em Paranavaí e Francisco Beltrão (CAMPOS *et al.*, 2020). Entretanto, até o momento nenhum trabalho havia sido realizado no município de Paranaguá, sendo este o primeiro município da região litorânea a ser avaliado, onde foi confirmada a resistência em *A. aegypti* ao malation.

A cidade de Paranaguá, além de apresentar as condições climáticas adequadas ao desenvolvimento do vetor (VANHONI; MENDONÇA, 2008), como cidade portuária, é ponto de chegada de navios de origem em diferentes continentes, bem como de caminhões de diferentes regiões do estado do Paraná, regiões sul, sudeste e centro-oeste do país e também de países como Paraguai e Argentina. A

área urbana do município pode ser considerado um ponto de chegada de populações de *A. aegypti* com diferentes níveis de suscetibilidade aos inseticidas autorizados para seu controle pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Portos são áreas de fronteiras mundiais onde deve haver maior vigilância pois pode haver a entrada de vetores vindos de outros locais com características genéticas diferentes e com diferentes estados de resistência a inseticidas (PASTEUR *et al.*, 1995; MACORIS *et al.*, 2007; MAITRA *et al.*, 2019; SCHMIDT *et al.*, 2019). Por exemplo, mosquitos coletados em portos e grandes cidades são os que apresentaram maior heterogeneidade genética em um estudo realizado em países da Ásia (HLAING *et al.*, 2010). Genes de esterases, associados à resistência a organofosforados em *Culex*, foram importados através de portos e aeroportos para a Polinésia Francesa (PASTEUR *et al.*, 1995). Da mesma forma, SCHMIDT *et al.*, (2019) estudaram a origem de mosquitos *A. aegypti* em portos internacionais da Austrália bem como a resistência a piretróides nessas áreas, encontrando populações com origem em outros países e alelos que conferem alta resistência a piretróides, que não existem em outros locais do país. Resultado semelhante foi obtido num estudo sobre a resistência a inseticidas no estado de São Paulo em que a cidade de Santos, onde fica o maior porto do país, apresentou o maior nível de resistência ao temefós em relação às demais cidades estudadas no estado (MACORIS *et al.*, 2007). Este cenário, em ambos os casos, é resultado da forte pressão de seleção causada pelo controle de vetores na área portuária, além de que as populações de vetores possivelmente introduzidas de outros locais do mundo apresentem algum nível de resistência (PASTEUR *et al.*, 1995; MACORIS *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2019). É possível que a cidade de Paranaguá, tendo um porto com fronteiras mundiais, possa estar sob condições semelhantes ao observado em outras cidades portuárias.

Da mesma forma, o transporte de cargas entre o município de Paranaguá e outras cidades do estado pode propiciar a dispersão do vetor passivamente e acidentalmente pelas rodovias (HUBER *et al.*, 2004; GONÇALVES DA SILVA *et al.*, 2012; MAITRA *et al.*, 2019), vindos de outros locais onde também pode estar ocorrendo seleção de resistência ao malation, mais especificamente, como observado em outras regiões do estado (CAMPOS *et al.*, 2020; LEANDRO *et al.*, 2020). A associação entre dispersão de vetores através e transporte terrestre já foi evidenciada em vários trabalhos.

GONÇALVES DA SILVA *et al.* (2012) obtiveram evidências de fluxo gênico entre populações de *A. aegypti* do Sul e Sudeste com Nordeste e Noroeste do Brasil através de rodovias. Da mesma forma, já foi registrada similaridade genética entre populações de *A. aegypti* geograficamente muito distantes para dispersão ativa, incluindo colonização de populações do Norte do Brasil vindas do Sul (MAITRA *et al.*, 2019). Foi registrada também a disseminação de alelos de resistência a piretróides por transporte viário para Jacarezinho (PR) (AGUIRRE-OBANDO *et al.*, 2016) e alta incidência de dengue e resistência a piretróides em cidades que margeiam a rodovia BR-153 em Tocantins (DE SÁ *et al.*, 2019). Populações de *A. aegypti* da Argentina estudadas ao longo da Rota nº2 se dispersaram 59,5 Km no período de um ano, evidenciando a grande influência do tráfego humano na dispersão (DÍAZ-NIETO *et al.*, 2016). Um estudo realizado no sudeste da Ásia entre duas localidades conectadas por grandes rodovias, populações de mosquitos coletados no norte da Tailândia eram geneticamente semelhantes a mosquitos do sul deste país, enquanto duas populações mais próximas entre si tinham maiores diferenças genéticas (HLAING *et al.*, 2010).

Neste trabalho não foi estudada a origem da população de mosquitos presentes, entretanto a origem do desenvolvimento da resistência nessa população pode ser observada na medida em que o controle químico é utilizado com a mesma intensidade com que ocorrem aumento de casos de dengue e mortes (VALLE *et al.*, 2019), o que ocorreu recentemente na história da cidade de Paranaguá. Além disso, os fatores citados acima são possíveis complicadores da resistência na cidade de Paranaguá e podem estar associados com a evidente pressão de seleção com o inseticida malation na cidade.

7.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA

Neste estudo foi avaliada a expressão gênica de enzimas relacionadas à resistência em fêmeas de *A. aegypti* resistentes de Paranaguá, diagnosticadas através de bioensaios de exposição ao malation. Das três enzimas estudadas, apenas a citocromo oxidase P₄₅₀ (*CYP6N12*) teve aumento significativo de expressão gênica em resposta à exposição ao malation, enquanto a esterase β (*CCae3a*) e acetilcolinesterase não apresentaram alterações.

O aumento de expressão gênica da citocromo oxidase P₄₅₀ (*CYP6N12*) já foi registrada para organofosforados, piretróides e neonicotinóides (STRODE *et al.*, 2012; VONTAS *et al.*, 2012; RIAZ *et al.*, 2013; REID *et al.*, 2014; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2019;), entretanto, ainda não havia sido registrada especificamente para o malation. Mesmo num estudo realizado com uma população de *A. aegypti* de Recife selecionada em laboratório para a resistência ao malation, porém não expostas previamente, não apresentou alteração da expressão deste gene (THORNTON *et al.*, 2020). STRODE *et al.* (2012) obtiveram forte superexpressão da P₄₅₀ (*CYP6N12*) em larvas e adultos de uma população brasileira de *A. aegypti*, selecionada em laboratório para resistência ao organofosforado temefós, entretanto era suscetível ao malation e piretróides.

Diversos trabalhos têm indicado a associação de citocromo oxidase P₄₅₀ principalmente com a resistência a piretróides, enquanto há pouca participação em relação aos organofosforados. Para estes, aponta-se a participação das esterases como o principal mecanismo de resistência em mosquitos através da amplificação gênica ou mutações pontuais (NAUEN, 2007).

No processo de resistência aos organofosforados, têm sido associadas as famílias CYP6 e CYP9 (NAQQASH *et al.*, 2016), registrando a participação de outros genes de citocromo oxidase P₄₅₀, não estudados aqui, na resistência também ao malation. Por exemplo, já foi evidenciada a superexpressão decorrente de amplificação gênica de *CYP6M11* (GOINDIN *et al.*, 2017) e o aumento de expressão gênica, sem exposição prévia ao malation, de *CYP9J28* e *CYP6BB2* (THORNTON *et al.*, 2020). Desta forma, estes dados coincidem com o observado neste estudo, uma vez que também obtiveram alteração na expressão gênica de citocromo oxidase P₄₅₀ da família CYP6 em populações resistentes ao malation. Similarmente, estudos utilizando ensaios enzimáticos também já demonstraram a participação de monooxigenases na resistência ao malation (MARCOMBE *et al.*, 2019), entretanto, estes ensaios são pouco sensíveis e específicos para detectar pequenas alterações e elucidar quais genes participam da resistência (STRODE *et al.*, 2012).

Neste estudo foi evidenciada a participação da enzima CYP6N12 em resposta à exposição ao malation, entretanto não é possível afirmar que este resultado indique sua participação direta na resistência observada, uma vez que a função biológica de monooxigenases em relação ao princípio ativo malation é a sua bioativação à forma mais tóxica, que é reconhecida por esterases (FEYEREISEN, 1999; SCOTT, 1999;

HEMINGWAY *et al.*, 2004). Este ponto relevante sobre a função das monooxigenases, por sua vez, não é levantado nos estudos que obtiveram alteração da sua expressão em relação ao malation, não sendo claro o papel dessa classe de enzimas em relação à resistência a este inseticida (GOINDIN *et al.*, 2017; THORNTON *et al.*, 2020).

Em contraste com este estudo, a superexpressão do gene da esterase β CCae3A já foi encontrada associada à resistência ao malation (GOINDIN *et al.*, 2017; MARCOMBE *et al.*, 2019; THORNTON *et al.*, 2020), bem como a outros organofosforados, como o temefós, que concentra maior quantidade de estudos (MARCOMBE *et al.*, 2009, 2012; STRODE *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2016; GOINDIN *et al.*, 2017) e até piretróides (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2019). Da mesma forma, também já foi encontrado aumento da atividade de carboxilesterases relacionadas à resistência ao malation (MARCOMBE *et al.*, 2014; LÓPEZ-SOLÍS *et al.*, 2020), assim como resultado de superexpressão (BHARATI; SAHA, 2018b; MARCOMBE *et al.*, 2019).

Entretanto, embora a ausência de resultados de alteração na expressão ou amplificação gênica de CCEae3A não tenha importância central nos estudos, em levantamentos realizados sobre a sua distribuição geográfica, nem todas as populações coletadas de mosquitos *A. aegypti* ou *A. albopictus* apresentam estas alterações (GRIGORAKI *et al.*, 2017; DJIAPPI-TCHAMEN *et al.*, 2021), assim como observado neste estudo.

De forma geral, o mecanismo mais comum de resistência envolvendo esterases é a amplificação gênica que promove o sequestro aumentado de inseticida (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; GRIGORAKI *et al.*, 2016). Entretanto, a resistência devido ao aumento do metabolismo causado por mutações pontuais no gene e que aumentam a especificidade e velocidade de hidrólise dos organofosforados pela enzima são mais frequentes na resistência ao malation, em mosquitos (WHYARD; DOWNE; WALKER, 1995; HEMINGWAY, 2000; HEMINGWAY *et al.*, 2004).

Desta forma, ainda que neste estudo não tenha sido observado o aumento da expressão gênica da esterase β , indicando sua baixa ou nula participação na resistência ao malation na população avaliada através do mecanismo de superexpressão, é possível que outro mecanismo relacionado à esterase e não detectados aqui, como aumento da metabolização do inseticida, possa estar atuando na resistência. Esta hipótese é reforçada pelos resultados obtidos em relação à

citocromo oxidase P₄₅₀ que atua na bioativação do malation à forma mais tóxica, que interage com esterases (FEYEREISEN, 1999; SCOTT, 1999; HEMINGWAY *et al.*, 2004). Assim, as fêmeas resistentes devem apresentar outros mecanismos que estejam atuando na biotransformação do malaoxon e possibilitem sua sobrevivência. Como exemplo, há estudos que obtiveram aumento da expressão de CYPs em populações resistentes ao malation, entretanto esta foi acompanhada também do aumento de CCEae3A (GOINDIN *et al.*, 2017; THORNTON *et al.*, 2020)

Neste estudo a acetilcolinesterase avaliada não apresentou alteração na sua expressão. Em mosquitos *Culex* e *Anopheles* já foram encontradas duplicações do gene *ace-1* relacionados à elevada resistência por causar maior expressão gênica da acetilcolinesterase (LABBÉ *et al.*, 2007; DJOGBÉNOU *et al.*, 2008; EDI *et al.*, 2014). Entretanto, para mosquitos *Aedes*, não há estudos da expressão gênica da acetilcolinesterase, sendo mais comum estudos que avaliam a atividade enzimática e insensibilidade do sítio ativo (VIANA-MEDEIROS; BELLINATO; VALLE, 2018; VALLE *et al.*, 2019).

A insensibilidade do sítio ativo da acetilcolinesterase devido a mutação no gene *ace-1* é fortemente associada à alta resistência a organofosforados e carbamatos em espécies de mosquitos *Culex* e *Anopheles* (HEMINGWAY *et al.*, 2004; WEILL *et al.*, 2004b). Entretanto, em mosquitos *Aedes*, as mutações G119S e F455W são improváveis (WEILL *et al.*, 2004b; MORI *et al.*, 2007), a mutação T506T é silenciosa (HASMIWATI; RUSJDI; NOFITA, 2018) e, embora a substituição F290V seja mais provável (MORI *et al.*, 2007), são raras as mutações *ace-1* que afetem consideravelmente a resistência aos organofosforados em *A. aegypti* (BISSET; RODRÍGUEZ; FERNÁNDEZ, 2006; MORI *et al.*, 2007; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

Alterações de atividade enzimática decorrentes da mutação do sítio ativo, da mesma forma, parecem ser pouco importantes na resistência a organofosforados (MARCOMBE *et al.*, 2009; STRODE *et al.*, 2012), sendo a resistência metabólica geral mais importante para a resistência (MARCOMBE *et al.*, 2009, 2012). Em coincidência com esta informação, BISSET; RODRÍGUEZ; FERNÁNDEZ (2006) selecionaram uma população de *A. aegypti* de Cuba, resistente a carbamatos, por 13 gerações e observaram um aumento constante da insensibilidade da acetilcolinesterase através de ensaios bioquímicos, entretanto, não houve resistência cruzada com organofosforados, incluindo malation.

No Brasil, apesar de algumas populações de *A. aegypti* apresentarem aumento de atividade da acetilcolinesterase, a maioria não apresentou modificações, e todas até o momento foram consideradas sensíveis à inibição por inseticida (VALLE *et al.*, 2019), inclusive ao malation (VIANA-MEDEIROS; BELLINATO; VALLE, 2018). Entretanto, já foi sugerido que o aumento de atividade poderia ser relacionado à amplificação gênica ou expressão aumentada em uma população do Ceará com atividade enzimática aumentada (VIANA-MEDEIROS *et al.*, 2017). Desta forma, dada a baixa possibilidade de os mecanismos moleculares de resistência ocorrerem, associado ao resultado obtido neste estudo, que evidencia não haver alteração da expressão gênica e nem amplificação gênica em relação a esta enzima, é provável que a acetilcolinesterase não tenha participação na resistência observada. Entretanto, outros métodos como atividade enzimática e sequenciamento podem comprovar isto, posteriormente, para indicar se há insensibilidade se sítio ativo e/ou mutações neste local.

De uma forma geral, no mesmo contexto dos resultados deste estudo, VALBON *et al.* (2019) estudaram uma população do Rio de Janeiro resistente a piretróides que não apresentou aumento de atividade enzimática de citocromo P₄₅₀, associada a esta classe, mas houve aumento de atividade enzimática de GST e esterases. Isso evidencia a complexidade da resposta de defesa dos mosquitos e demonstra, que além da resistência aos piretróides, a população tem os mecanismos necessários para se defender de outras moléculas tóxicas ambientais, inclusive inseticidas com outro modo de ação (VALBON *et al.*, 2019). Além disso, já foi sugerido que diferentes populações de vetores podem apresentar distintos mecanismos de resistência metabólica, bem como a expressão de uma grande variedade de genes, dificultando ou impossibilitando que sejam definidos mecanismos diagnósticos que caracterizem indivíduos resistentes a um inseticida (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012; VALLE *et al.*, 2019).

Considerando a participação de citocromo oxidase P₄₅₀ na resistência a piretróides, neonicotinóides e organofosforados (STRODE *et al.*, 2012; VONTAS *et al.*, 2012; RIAZ *et al.*, 2013; REID *et al.*, 2014; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2019) é possível que a população de *A. aegypti* de Paranaguá tenha algum grau de resistência aos piretróides, uma vez que esta classe de inseticida está disponível em mercados para uso doméstico (VALLE *et al.*, 2019) e está sendo utilizado no controle

vetorial, bem como os neonicotinóides (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2019; GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2020;).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Paranaguá é uma cidade litorânea do estado do Paraná que, até 2014, não havia registrado casos autóctones de dengue e nem era considerada como infestada pelo vetor, *Aedes aegypti*. Entretanto, abruptamente, em 2015/2016 ocorreu uma epidemia de dengue que causou mortes e a indicação de que cidade estava infestada com o mosquito, havendo a necessidade de controle químico emergencial do vetor, com malation, contribuindo com a pressão de seleção sobre os vetores.

Para testar a sensibilidade desta população ao malation, foi estabelecida neste trabalho a concentração discriminante de 3,41 %, obtida através de uma curva de calibração em fêmeas do insetário referência de *A. aegypti*. Fêmeas da população de *A. aegypti* de Paranaguá foram expostas a esta concentração nos bioensaios de suscetibilidade e os resultados indicaram que esta população tem resistência ao malation.

A expressão gênica de acetilcolinesterase, esterase β e citocromo oxidase P₄₅₀ foi avaliada em fêmeas resistentes ao malation para determinar a participação de mecanismos moleculares envolvidos na resistência. Houve alteração na expressão gênica apenas da enzima citocromo oxidase P₄₅₀ através do mecanismo de regulação positiva, enquanto não houve alteração na expressão de acetilcolinesterase e esterase β , indicando que os mecanismos de regulação positiva e/ou amplificação gênica não estão atuando na população avaliada.

As citocromo oxidases P₄₅₀ atuam na bioativação do malation à sua forma mais tóxica, malaaxon, que interage com esterases. Desta forma, embora a esterase β não esteja atuando através do aumento da expressão gênica, é possível que possa participar da resistência observada por meio de outros mecanismos como aumento de atividade enzimática a este inseticida. De outra forma, mutações pontuais da acetilcolinesterase em *Aedes* são raras e não há evidências da atuação desta enzima na resistência através de amplificação gênica e/ou aumento de expressão gênica, assim como obtido neste trabalho, de forma que, possivelmente, esta enzima não está atuando na resistência observada ao malation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHEE, N. L. *et al.* A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–19, 2015.
- AGUIRRE-OBANDO, O. A. *et al.* Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (*kdr*) in *Aedes aegypti* populations from Jacarezinho (Brazil) after a Dengue Outbreak. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 94–100, 2016.
- AÏZOUN, N. *et al.* Comparison of the standard WHO susceptibility tests and the CDC bottle bioassay for the determination of insecticide susceptibility in malaria vectors and their correlation with biochemical and molecular biology assays in Benin, West Africa. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2013.
- ALDRIDGE, W. N. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. **The Biochemical journal**, v. 53, p. 110–117, 1953.
- ALDRIDGE, W. N. The esterases: Perspectives and problems. **Chemico-Biological Interactions**, v. 87, p. 5–13, 1993.
- ALOUT, H. *et al.* A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 41–47, jan. 2007.
- ANDRIOLI, D. C.; BUSATO, M. A.; LUTINSKI, J. A. Spatial and temporal distribution of dengue in Brazil, 1990 - 2017. **PLOS ONE**, v. 15, n. 2, p. e0228346, 13 fev. 2020.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
- ARSLAN, A. *et al.* Spatial distribution and insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in dengue affected urban areas of Rawalpindi, Pakistan. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, p. 136–143, 2016.
- BAILLIE, A. C. The Biochemical Mode of Action of Insecticides. In: KEYSERLINGK, H. C. VON; JÄGER, A.; SZCZEPANSKI, C. VON (Eds.). **Approaches to New Leads for Insecticides. Proceedings in Life Sciences**. 1. ed. Berlin: 1985. p. 9–18.
- BELLINATO, D. F. *et al.* Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–12, 2016.
- BHARATI, M.; SAHA, D. Assessment of insecticide resistance in primary dengue vector, *Aedes aegypti* (Linn.) from Northern Districts of West Bengal, India. **Acta Tropica**, v. 187, p. 78–86, 2018b.

BHARATI, M.; SAHA, D. Insecticide susceptibility status and major detoxifying enzymes activity in *Aedes albopictus* (Skuse), vector of dengue and chikungunya in Northern part of West Bengal, India. **Acta Tropica**, v. 170, p. 112–119, 2017.

BHARATI, M.; SAHA, D. Multiple insecticide resistance mechanisms in primary dengue vector, *Aedes aegypti* (Linn.) from dengue endemic districts of sub-Himalayan West Bengal, India. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–13, 2018a.

BIO-RAD. **Reagent Comparison Guide for Real-Time PCR**. BioRad Bulletin 6252: 2013.

BISSET, J.; RODRÍGUEZ, M. M.; FERNÁNDEZ, D. Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 6, p. 1185–1189, 2006.

BOGOCH, I. I. *et al.* Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 335–336, jan. 2016.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007a.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 295–302, 2007b.

BRASIL. **Lei nº 11.936, de 14 de maio de 2009**. Proíbe a fabricação, a importação, a exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso de diclorodifeniltricloreto (DDT) e dá outras providências. Disponível em: <<https://legis.senado.leg.br/norma/580159/publicacao/15838169>>. Acesso em: 20 maio. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Manual de dengue: vigilância epidemiológica e atenção ao doente**. 2ª ed. Brasília: DEOP, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela**. 1ª ed. Brasília: 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Larvicidas. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/larvicidas>>. Acesso em: 8 maio. 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Nota Informativa nº 103/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS**. Recomendações para Manejo da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. Brasília: 2019.

BROGDON, W. G.; CHAN, A. **Diretriz para Avaliar a Resistência a Inseticida em Vetores Usando o Bioensaio com Garrafa do CDC**. Atlanta: 2013.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 14, n. 2, p. 159–164, 1998.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAMPOS, K. B. *et al.* Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 531, 27 dez. 2020.

CHEN, A.; ROGAN, W. J. Nonmalarial infant deaths and ddt use for malaria control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 960–964, 2003.

COLOVIC, M. B. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.

COUTO-LIMA, DI. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4848, 7 dez. 2017.

CUI, F. *et al.* Carboxylesterase-mediated insecticide resistance: Quantitative increase induces broader metabolic resistance than qualitative change. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 88–96, 2015.

DA-CUNHA, M. P. *et al.* Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 441–444, 2005.

DAVID, J. P. *et al.* Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 174, p. 1–15, 2014.

DE SÁ, E. L. R. *et al.* Evaluation of insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations connected by roads and rivers: The case of tocanins state in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. 1–10, 2019.

DÍAZ-NIETO, L. M. *et al.* Genetic Evidence of Expansion by Passive Transport of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in Eastern Argentina. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004839, 1 set. 2016.

DJIAPPI-TCHAMEN, B. *et al.* Analyses of Insecticide Resistance Genes in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquito Populations from Cameroon. **Genes**, v. 12, n. 6, p. 828, 28 maio 2021.

DJOGBÉNOU, L. *et al.* Evidence of Introgression of the *ace-1R* Mutation and of the *ace-1* Duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. e2172, 14 maio 2008.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259–279, 2002. DOI: 10.1590/s1415-790x2002000300005.

DONNELLY, M. J.; ISAACS, A. T.; WEETMAN, D. Identification, Validation, and Application of Molecular Diagnostics for Insecticide Resistance in Malaria Vectors. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 3, p. 197–206, mar. 2016.

DOS SANTOS, C. R. *et al.* Insecticide resistance, fitness and susceptibility to Zika infection of an interbred *Aedes aegypti* population from Rio de Janeiro, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 293, 8 dez. 2020.

DZAKI, N. *et al.* Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43618, 16 abr. 2017.

EDI, C. V. *et al.* CYP6 P450 Enzymes and *ACE-1* Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 3, p. e1004236, 20 mar. 2014.

FAUCON, F. *et al.* Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. **Genome Research**, v. 25, n. 9, p. 1347–1359, set. 2015.

FAUCON, F. *et al.* In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: An integrated next-generation sequencing approach. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005526, 5 abr. 2017.

FAY, R. W.; ELIASON, Donald A. A preferred oviposition site as surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 26, n. 4, p. 531–535, 1966.

FERRER, A. Intoxicación por plaguicidas. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 26, n. Suplemento 1, p. 155–171, 2003.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 507–533, 1999.

FOLHA DO LITORAL. Sete carros “fumacê” voltam a atuar em Paranaguá. **Folha do Litoral News**. Disponível em: <<https://folhadolitoral.com.br/ciencia-e-saude/sete-carros-fumace-voltam-a-atuar-em-paranagua>>. Acesso em: 14 ago. 2021.

FOLHA DO LITORAL. “Fumacê” vai circular em Paranaguá até fevereiro. **Folha do Litoral News**. Disponível em: <<https://folhadolitoral.com.br/ciencia-e-saude/fumace-vai-circular-em-paranagua-ate-fevereiro>>. Acesso em: 14 ago. 2021.

FRANCIS, S. *et al.* Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179673, 26 jun. 2017.

G1 PR. Cidades do norte do Paraná estão sem veneno que combate o Aedes. **Portal de notícias da Globo**. 2016. Disponível em <<http://g1.globo.com/pr/norte-noroeste/noticia/2016/02/cidades-do-norte-do-parana-estao-sem-veneno-que-combate-o-aedes.html>>. Acesso em: 17 jun. 2021.

GAMA, J. Ecotoxicology: Methods for Ecotoxicology. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ecotoxicology/index.html>>. Acesso em: 3 nov. 2018.

GARCIA, G. DE A. *et al.* The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006227, 12 fev. 2018.

GEORGHIOU, G. P. Principles of insecticide resistance management. **Phytoprotection**, v. 75, n. 4, p. 51–59, 12 abr. 1994.

GEORGHIOU, G. P.; PASTEUR, N.; HAWLEY, M. K. Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase-B in *Culex quinquefasciatus* from California. **Journal of economic entomology**, v. 73, n. 2, p. 301–305, 1980.

GOINDIN, D. *et al.* Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 38, 10 dez. 2017.

GONÇALVES DA SILVA, A. *et al.* Gene flow networks among American *Aedes aegypti* populations. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 7, p. 664–676, nov. 2012.

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. Força-tarefa contra dengue apresenta primeiros resultados positivos. 2020. Disponível em: <<http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=105310&tit=Forca-tarefa-contra-dengue-apresenta-primeiros-resultados-positivos>>. Acesso em: 26 set. 2020.

GRIGORAKI, L. *et al.* Functional and immunohistochemical characterization of *CCEae3a*, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, p. 61–67, jul. 2016.

GRIGORAKI, L. *et al.* Carboxylesterase gene amplifications associated with insecticide resistance in *Aedes albopictus*: Geographical distribution and evolutionary origin. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005533, 10 abr. 2017.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.

GUIDEZ, A. *et al.* Spatiotemporal multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations in French Guiana: need for alternative vector control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 12, p. 1–9, 2020.

HAMID, P. H. *et al.* *Aedes aegypti* resistance development to commonly used insecticides in Jakarta, Indonesia. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189680, 18 dez. 2017.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood? **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 411–422, 2001.

HASMIWATI, H.; RUSJDI, S. R.; NOFITA, E. Detection of *Ace-1* gene with insecticides resistance in *Aedes aegypti* populations from DHF-endemic areas in Padang, Indonesia. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 19, n. 1, p. 31–36, 1 jan. 2018.

HAYD, R. L. N. *et al.* Evaluation of resistance to pyrethroid and organophosphate adulticides and *kdr* genotyping in *Aedes aegypti* populations from Roraima, the northernmost Brazilian State. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 264, 20 dez. 2020.

HEMINGWAY, J. Malathion carboxylesterase enzymes in *Anopheles arabiensis* from Sudan. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 23, p. 309–313, 1985.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 1009–1015, 2000.

HEMINGWAY, J. *et al.* The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 653–665, jul. 2004.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. P. P. Mosquito carboxylesterases: A review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 1998.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 371–391, jan. 2000.

HLAING, T. *et al.* Spatial genetic structure of *Aedes aegypti* mosquitoes in mainland Southeast Asia. **Evolutionary Applications**, v. 3, n. 4, p. 319–339, jul. 2010.

HUBER, K. *et al.* Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 23–29, mar. 2004.

HUTCHINGS, R.; SALLUM, M.; HUTCHINGS, R. Culicidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/49678>>. Acesso em: 11 maio. 2021.

IBGE. Paranaguá. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/paranagua/panorama>>. Acesso em: 26 mar. 2021.

IBGE. Cidades e estados. Disponível em: <www.ibge.gov.br/cidades-e-estados.html?view=municipio>. Acesso em: 27 maio. 2021.

IOC/FIOCRUZ. **Nota técnica nº 2/2011/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA**. Recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretróides no controle do *Aedes aegypti* no Brasil. Rio de Janeiro: 2011.

IOC/FIOCRUZ. **Nota técnica nº 4/2016/IOC-Fiocruz/Diretoria**. Considerações técnicas sobre a aplicação aérea de inseticidas em área urbana. Rio de Janeiro: 2016.

JUNTARAJUMNONG, W. *et al.* Discriminating lethal concentrations and efficacy of six pyrethroids for control of *Aedes aegypti* in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 1, p. 30–37, 2012.

KAMGANG, B. *et al.* Temporal distribution and insecticide resistance profile of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Yaoundé, the capital city of Cameroon. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 469, 10 dez. 2017.

KANTOR, I. N. Dengue, Zika y Chikungunya. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 76, n. 2, p. 1–5, 2016.

KARUNARATNE, S. H. P. P. *et al.* Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochemical Journal**, v. 294, n. 2, p. 575–579, 1993.

KARUNARATNE, S. H. P. P. *et al.* Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 52, p. 31124–31128, 1995.

KARUNARATNE, S. H. P. P. *et al.* Insecticide resistance and, efficacy of space spraying and larviciding in the control of dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Sri Lanka. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 1, p. 98–105, set. 2013.

KARUNARATNE, S. H. P. P.; HEMINGWAY, J. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 11, p. 1060–1064, 2001.

KONNO, T.; HODGSON, E.; DAUTERMAN, W. C. Studies on methyl parathion resistance in *Heliothis virescens*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 33, n. 2, p. 189–199, 1989.

KUNO, G. Early History of Laboratory Breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Focusing on the Origins and Use of Selected Strains. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 6, p. 957–971, 1 nov. 2010.

LABBÉ, P. *et al.* Independent Duplications of the Acetylcholinesterase Gene Conferring Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex pipiens*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 4, p. 1056–1067, abr. 2007.

LAURA BEAL BORDIN. Epidemia de dengue em Paranaguá era “tragédia anunciada”, diz MP. **Gazeta do Povo**: 2016. Disponível em: <<https://www.gazetadopovo.com.br/vida-e-cidadania/epidemia-de-dengue-em-paranagua-era-tragedia-anunciada-diz-mp-7s0mh54abht55t5kl0qypxpu1/%0D>>. Acesso em: 9 maio. 2020.

LEANDRO, A. DE S. *et al.* Malathion insecticide resistance in *Aedes aegypti*: laboratory conditions and in situ experimental approach through adult entomological surveillance. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 10, p. 1271–1282, 6 out. 2020.

LEONG, C.-S. *et al.* Enzymatic and molecular characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* from Selangor, Malaysia. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 236, 16 dez. 2019.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 231–253, 2007.

LI, Y. *et al.* Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 4, 3 dez. 2018.

LIMA, J. B. P. *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 329–333, 2003.

LIU, N. *et al.* Cytochrome P450s – Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 77–81, maio 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LÓPEZ-SOLÍS, A. D. *et al.* Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México. **Salud Pública de México**, v. 62, n. 4, p. 439, 12 jun. 2020.

LOREDO, P. V. M. Avaliação do efeito da seleção de populações de campo de *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) com o inseticida organofosforado malathion. 206 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

MACIEL-DE-FREITAS, R. *et al.* Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92424, 27 mar. 2014.

MACORIS, M. D. L. D. G. *et al.* Standardization of bioassays for monitoring resistance to insecticides in *Aedes aegypti*. **Dengue Bulletin**, v. 29, p. 176–182, 2005.

MACORIS, M. D. L. D. G. *et al.* Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 895–900, dez. 2007.

MACORIS, M. DE L. *et al.* Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006390, 30 mar. 2018.

MACORIS, M. DE L. DA G. Avaliação do nível de suscetibilidade de linhagens de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) aos inseticidas utilizados para seu controle. 75 f. Tese (Mestrado em Saúde Coletiva) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

MAITRA, A. *et al.* Exploring deeper genetic structures: *Aedes aegypti* in Brazil. **Acta Tropica**, v. 195, n. January, p. 68–77, jul. 2019.

MALLET, J. The evolution of insecticide resistance: Have the insects won? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 11, p. 336–340, 1989.

MARCOMBE, S. *et al.* Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 494, 2009.

MARCOMBE, S. *et al.* Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30989, 21 fev. 2012.

MARCOMBE, S. *et al.* Insecticide Resistance Status of United States Populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms Involved. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101992, 11 jul. 2014.

MARCOMBE, S. *et al.* Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *Aedes aegypti* in Laos and implication for vector control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007852, 12 dez. 2019.

MARTINS, A. J. *et al.* Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, n. 11, p. 1351–1355, nov. 2009.

MATHENGE, E. M. *et al.* Effect of Permethrin-Impregnated Nets on Exiting Behavior, Blood Feeding Success, and Time of Feeding of Malaria Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 531–536, 1 jul. 2001.

MCCAFFERY, A.; NAUEN, R. The insecticide resistance action committee (IRAC): public responsibility and enlightened industrial self-interest. **Outlooks on Pest Management**, p. 11–14, 2006.

MELLO, Y. R. DE; LOPES, F. C. A.; ROSEGHINI, W. F. F. Características climáticas e análise rítmica aplicada a episódios extremos de precipitação e temperatura no município de Paranaguá, PR. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 20, p. 313–336, 2017.

MINERAIS DO PARANÁ - MINEROPAR. **Atlas Geomorfológico Do Estado Do Paraná**. 1ª ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dicas em Saúde: Febre Amarela. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/dicas/111febreamarela.html#:~:text=A febre amarela silvestre ocorre,transmissor da febre amarela urbana>. Acesso em: 13 maio. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. 1ª ed. Brasília: Editora MS, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico 41**. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 38, 2020. Brasília: 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim epidemiológico 02**. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 01 a 52. Brasília: 2020.

MORI, A. *et al.* Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (*Ace1*) from the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 7, p. 667–674, jul. 2007.

MUTH, F.; LEONARD, A. S. A neonicotinoid pesticide impairs foraging, but not learning, in free-flying bumblebees. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4764, 18 dez. 2019.

MUTHUSAMY, R.; SHIVAKUMAR, M. S. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu, India. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 52, n. 2, p. 159–165, 2015.

NABESHIMA, T. *et al.* An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 3, p. 794–801, 2004.

NAQQASH, M. N. *et al.* Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p. 1363–1373, 2016.

NAUEN, R. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. **Pest Management Science**, v. 63, n. 7, p. 628–633, jul. 2007.

NELSON, David R. *et al.* P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 1, p. 1–42, 1996. DOI: 10.1097/00008571-199602000-00002.

NUNES, A. *et al.* The use of pesticides in Brazil and the risks linked to human health / O uso de pesticidas no Brasil e os riscos associados à saúde humana. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37885–37904, 13 abr. 2021.

OCAMPO, C. B. *et al.* Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. **Acta Tropica**, v. 118, n. 1, p. 37–44, 2011.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Dengue. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

OWUSU, H. F. *et al.* Comparability between insecticide resistance bioassays for mosquito vectors: time to review current methodology? **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 357, 7 dez. 2015.

PAIVA, M. H. S. *et al.* Identification of a major Quantitative Trait Locus determining resistance to the organophosphate temephos in the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 40–48, 2016.

PASTEUR, N. *et al.* The role of passive migration in the dispersal of resistance genes in *Culex pipiens quinquefasciatus* within French Polynesia. **Genetical Research**, v. 66, n. 2, p. 139–146, 1995.

PENNA, M. L. F. Um desafio para a saúde pública brasileira: O controle da dengue. **Cadernos de saúde pública**, v. 19, n. 1, p. 305–309, 2003.

PINTO, J. *et al.* Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in three populations of *Aedes aegypti* from Peru. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 494, 22 dez. 2019.

R CORE TEAM. The R Project for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 2 nov. 2018.

RAHIM, J. *et al.* Adulticidal Susceptibility Evaluation of *Aedes albopictus* Using New Diagnostic Doses in Penang Island, Malaysia. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 3, p. 200–208, 2017.

RAHMAN, R. U. *et al.* Insecticide resistance and genetic structure of *Aedes aegypti* populations from Rio de Janeiro State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0008492, 16 fev. 2021.

REID, W. R. *et al.* Transcriptional analysis of four family 4 P450s in a Puerto Rico strain of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) compared with an orlando strain and their possible functional roles in permethrin resistance. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 605–615, 2014.

RIAZ, M. A. *et al.* Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 326–337, 2013.

RIEDEL, G. *et al.* An Extended Δ CT-Method Facilitating Normalisation with Multiple Reference Genes Suited for Quantitative RT-PCR Analyses of Human Hepatocyte-Like Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e93031, 21 mar. 2014.

RIVERO, A. *et al.* Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. e1001000, 5 ago. 2010.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7ª ed. São Paulo: Editora Roca, 2005.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. *et al.* Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v. 21, n. 1, p. 61–77, fev. 2012.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. *et al.* Exome-wide association of deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* from Mexico. **Insect Molecular Biology**, v. 28, n. 5, p. 591–604, 2019.

SALEEM, M. S.; HUANG, Z. Y.; MILBRATH, M. O. Neonicotinoid Pesticides Are More Toxic to Honey Bees at Lower Temperatures: Implications for Overwintering Bees. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, n. October, p. 1–8, 19 out. 2020.

SCHIESARI, L. **Defensivos Agrícolas: Como evitar danos à saúde e ao meio ambiente**. São Paulo: Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia, 2012.

SCHMIDT, T. L. *et al.* Tracking genetic invasions: Genome-wide single nucleotide polymorphisms reveal the source of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* (yellow fever mosquito) incursions at international ports. **Evolutionary Applications**, v. 12, n. 6, p. 1136–1146, 2019.

SCOTT, J. G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 9, p. 757–777, 1999.

SCOTT, J. G.; LIU, N.; WEN, Z. Insect cytochromes P450: Diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 121, n. 1–3, p. 147–155, 1998.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. Boletins da dengue. Disponível em: <www.dengue.pr.gov.br/Pagina/Boletins-da-Dengue>. Acesso em: 25 maio. 2021a.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. Boletim de Infestação Predial. Disponível em: <<http://www.dengue.pr.gov.br/Pagina/Boletim-Infestacao-Predial>>. Acesso em: 25 maio. 2021b.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Informe técnico 01.** Situação da Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Paraná, 2015/2016. 2015.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Informe técnico 03.** Situação da Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Paraná, 2015/2016. 2015.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Informe técnico 05.** Situação da Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Paraná, 2015/2016. 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Informe técnico 17.** Situação da Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Paraná, 2015/2016. 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Informe técnico 18.** Situação da dengue no Paraná – 2013/2014. 2014.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Informe técnico 23.** Situação Da Dengue No Paraná – 2014/2015. 2015.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Informe técnico 26.** Situação da Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Paraná, 2015/2016. 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Nota técnica nº 07/CVIA/DAV/SESA.** Inseticidas destinados ao controle de *Aedes aegypti*. Curitiba, 2019.

SEIFERT, J. Neonicotinoids. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. 2ª ed. Honolulu: Elsevier, 2005. p. 196–200.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. D. F.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa da erradicação às políticas de controle. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 3, n. 6, p. 163–175, 2008.

SILVA, W. C. *et al.* Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 293–298, 2007.

SMITH, D. L. *et al.* Ross, Macdonald, and a Theory for the Dynamics and Control of Mosquito-Transmitted Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002588, 5 abr. 2012.

SONI, M. *et al.* Bioassay and molecular study for detection of insecticide resistance dengue causing mosquito vectors. **Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 435–438, 2018.

STRODE, C. *et al.* Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 113–123, 2008.

STRODE, C. *et al.* Expression Profile of Genes during Resistance Reversal in a Temephos Selected Strain of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e39439, 1 ago. 2012.

TAYLOR, S. C. *et al.* The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 761–774, jul. 2019.

THORNTON, J. *et al.* Insecticide resistance selection and reversal in two strains of *Aedes aegypti*. **Wellcome Open Research**, v. 5, p. 183, 16 dez. 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Plano diretor de desenvolvimento integrado de Paranaguá**. Paranaguá, 2007.

VALBON, W. R. *et al.* “Armed to the teeth”: The multiple ways to survive insecticidal and predatory challenges in *Aedes aegypti* larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 156, n. November 2018, p. 87–95, maio 2019.

VALLE, D. *et al.* Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 3, p. 1–17, 2019.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. **Dengue: Teorias e práticas**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015.

VAN DEN BERG, H.; MANUWEERA, G.; KONRADSEN, F. Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 401, 5 dez. 2017.

VANDENBROUCKE, I. I. Quantification of splice variants using real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 13, p. 68e – 68, 1 jul. 2001.

VANHONI, F.; MENDONÇA, F. O Clima Do Litoral Do Estado Do Paraná. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 3, 2008.

VIANA-MEDEIROS, P. F. *et al.* Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, n. 4, p. 340–350, dez. 2017.

VIANA-MEDEIROS, P. F.; BELLINATO, D. F.; VALLE, D. Laboratory selection of *Aedes aegypti* field populations with the organophosphate malathion: Negative impacts on resistance to deltamethrin and to the organophosphate temephos. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006734, 20 ago. 2018.

VONTAS, J. *et al.* Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, p. 126–131, 2012.

WALISZEWSKI, S. M. *et al.* Comparison of organochlorine pesticide levels between abdominal and breast adipose tissue. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, n. 1, p. 156–162, 2003.

WALKER, C. H. The classification of esterases which hydrolyse organophosphates: Recent developments. **Chemico-Biological Interactions**, v. 87, p. 17–24, 1993.

WALTER REED BIOSYSTEMATICS UNIT. *Aedes aegypti* species page. Walter **Reed Biosystematics Unit Website| Smithsonian Institution**. Disponível em: <<http://wrbu.si.edu/vectorspecies/mosquitoes/aegypti>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. An Introduction to Insecticides. In: **The Pesticide Book**. 4ª ed. Ohio: MeisterPro Information Resources, 2004. p. 488.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

WEILL, M. *et al.* A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene *Drosophila*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1504, p. 2007–2016, 7 out. 2002.

WEILL, M. *et al.* Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. **Nature**, v. 423, p. 136–137, 2003.

WEILL, M. *et al.* The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2004a.

WEILL, M. *et al.* Insecticide resistance: a silent base. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. 552–553, 2004b.

WHEELLOCK, C. E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **Journal of Pesticide Science**, v. 30, n. 2, p. 75–83, 2005.

WHYARD, S.; DOWNE, A. E. R.; WALKER, V. K. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, n. 4, p. 329–342, 1995.

WILSON, A. L.; COURTENAY, O.; KELLY-HOPE, L. A.; *et al.* The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007831, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007831>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assembleia Mundial da Saúde aprova abordagem global abrangente contra doenças transmitidas por vetores. Disponível em:

<www.who.int/neglected_diseases/news/comprehensive_global_approach_against_vector-borne_diseases/en/>. Acesso em: 25 maio. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications**. Geneva: 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infographic: Dengue and severe dengue. Disponível em: < https://www.who.int/images/default-source/departments/ntd-library/dengue/infographics-and-illustrations/dengue-infographic.png?sfvrsn=ae8ce604_8 > em: <https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue#tab=tab_1>. Acesso em: 14 out. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Inseticide Resistance and Vector Control: Tenth Report of the Expert Committee on Insecticides**. Geneva: 1960.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. List of WHO Prequalified Vector Control Products. Disponível em: <www.who.int/pq-vector-control/prequalified-lists/en/>. Acesso em: 20 abr. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prequalification Team Vector Control Decision Document: Cielo ULV Adulticide Space Spray**. Geneva: 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides: Twenty-second Report of the WHO Expert Committee on Insecticides**. Geneva: 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Test Procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes**. 1ª ed. Geneva: 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes**. 2ª ed. Geneva: 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces**. Geneva: 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector resistance to pesticides: Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control Technical Report Series**. Geneva: 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO pesticide evaluation scheme: Years 50 of global leadership**. 1ª ed. Geneva: 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO specifications and evaluations for public health pesticides: Malathion**. Geneva: 2004.

ZARA, A. L. DE S. A. *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.

ZIEGLER, R. *et al.* General esterase, malathion carboxylesterase, and malathion resistance in *Culex tarsalis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 28, n. 2, p. 279–285, jun. 1987.

ANEXO I

COORDENADAS GEOGRÁFICAS DE OVITAMPAS EM PARANAGUÁ
(continua)

Estrato	Ovitampa	Latitude (y)	Longitude (x)
1	R002	-25.51239	-48.50572
1	R004	-25.51128	-48.50181
1	R010	-25.52705	-48.50887
1	R012	-25.52702	-48.51122
5	R087	-25.52786	-48.53171
6	R112	-25.51589	-48.53122
6	R113	-25.51405	-48.52892
6	R115	-25.51655	-48.52938
6	R118	-25.52010	-48.53453
6	R120	-25.51965	-48.53154
7	R137	-25.51066	-48.52444
7	R138	-25.50903	-48.52675
7	R142	-25.50730	-48.52478
9	R154	-25.51366	-48.53920
8	R157	-25.51293	-48.54138
8	R162	-25.51474	-48.54567
8	R165	-25.51144	-48.54382
9	R171	-25.56569	-48.57316
9	R179	-25.55552	-48.55755
9	R184	-25.53673	-48.53014
9	R188	-25.52817	-48.52712
10	R217	-25.53356	-48.52153
10	R218	-25.53376	-48.51868
11	R221	-25.53383	-48.54939
11	R224	-25.53084	-48.54835
11	R226	-25.53147	-48.54477
11	R229	-25.52950	-48.54382

(conclusão)			
Estrato	Ovitampa	Latitude (y)	Longitude (x)
11	R233	-25.52951	-48.54162
12	R238	-25.52749	-48.55016
12	R240	-25.52595	-48.55366
12	R241	-25.52641	-48.55488
13	R267	-25.56943	-48.55957
13	R271	-25.55910	-48.55345
14	R282	-25.57683	-48.58106
14	R284	-25.57481	-48.57716
14	R289	-25.57871	-48.57709
14	R291	-25.57858	-48.57330
15	R307	-25.52133	-48.49706
15	R311	-25.52952	-48.49919
15	R312	-25.52818	-48.50123
15	R322	-25.53279	-48.50992
15	R324	-25.52674	-48.49948

ANEXO II

QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DAS AMOSTRAS DE RNA UTILIZADAS NA EXPRESSÃO GÊNICA
(continua)

Grupo	Amostras	260/280	260/230	ng/uL
RN	RN11	2,12	0,82	50,8
	RN15	2,20	0,58	55,0
	RN17	2,15	0,53	31,3
	RN21	2,14	0,69	35,0
	RN43	2,12	0,73	66,0
	RN45	2,16	0,65	47,8
	RN46	2,06	1,29	34,0
	RN51	2,16	0,65	51,1
	RN54	2,13	0,83	75,1
	RN57	2,13	1,05	49,0
PN	PN01	2,06	1,49	50,4
	PN07	2,01	0,91	20,5
	PN09	2,09	1,34	34,5
	PN15	2,09	1,01	50,5
	PN33	2,09	0,87	102,3
	PN34	2,09	1,28	52,9
	PN37	2,08	1,71	92,3
	PN38	2,14	1,00	180,2
	PN39	2,11	0,87	90,8
	PN45	2,11	2,17	78,1
	PN46	2,08	1,21	29,6
	PN47	2,13	1,21	152,9
	PN48	2,10	1,41	76,8
	PN56	2,08	1,30	37,7

(continua)				
Grupo	Amostras	260/280	260/230	ng/uL
PC	PC16	2,08	1,17	29,0
	PC18	2,06	1,24	21,0
	PC35	2,09	0,85	17,3
	PC36	2,00	0,74	9,8
	PC40	2,05	1,11	22,6
	PC45	2,10	1,34	19,8
	PC48	2,10	0,54	24,1
	PC53	1,95	0,89	10,0
	PC57	2,08	1,18	33,9
	PC60	2,02	1,07	13,6
PV	PV18	1,96	0,62	59,6
	PV39	1,99	0,67	20,5
	PV43	1,97	0,86	59,3
	PV44	2,06	1,36	85,7
	PV46	2,04	0,79	108,4
	PV49	2,07	1,18	86,6
	PV50	2,09	0,68	70,0
	PV52	2,11	1,96	162,5
	PV54	2,08	0,93	43,3
	PV67	1,80	0,99	16,5
	PV69	2,08	1,74	34,1
	PV73	1,87	0,38	11,0
	PV81	1,88	0,6	15,2
	PV96	2,01	0,64	16,1
	PV101	2,09	0,96	72,0
	PV103	1,90	1,23	20,6
	PV105	1,85	0,78	19,0
	PV112	2,07	1,58	88,9
	PV114	2,13	1,45	89,6
	PV115	2,13	1,93	128,7

(conclusão)				
Grupo	Amostras	260/280	260/230	ng/uL
PV	PV119	2,15	1,11	27,3
	PV120	2,09	1,12	98,6
	PV123	2,08	0,74	85,0
	PV124	2,04	0,78	71,7